



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

Formulación de protocolos de criopreservación para el espermatóforo y la masa espermática de *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 “Langostino blanco” empleando el método de vitrificación

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en
Hidrobiología y Pesquería

AUTOR

Carlos Alberto TORRES PERA

ASESOR

Martha Esther VALDIVIA CUYA

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Torres, C. (2018). *Formulación de protocolos de criopreservación para el espermatóforo y la masa espermática de Litopenaeus vannamei Boone, 1931 “Langostino blanco” empleando el método de vitrificación*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO CON MENCIÓN EN HIDROBIOLOGÍA Y PESQUERÍA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 11:10 horas del 09 de octubre de 2018, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en **Hidrobiología y Pesquería** de **CARLOS ALBERTO TORRES PERA**.

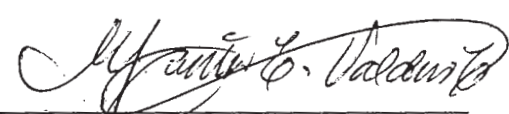
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 021-EPCB-2018, el titulando expuso su tesis: **"FORMULACIÓN DE PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN PARA EL ESPERMATÓFORO Y LA MASA ESPERMÁTICA DE *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 "Langostino blanco" EMPLEANDO EL MÉTODO DE VITRIFICACIÓN"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19..., calificativo: Aprobado con máximos honores.

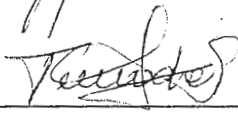
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Biólogo con mención en **Hidrobiología y Pesquería** a **CARLOS ALBERTO TORRES PERA** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

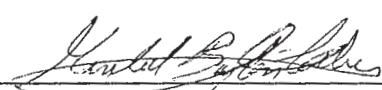
Siendo las 12:05 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 09 de octubre de 2018.


Blgo. JOSE LUIS PINO GAVIÑO
(PRESIDENTE)


Mg. MARTHA VALDIVIA CUYA
(ASESORA)


Blga. HAYDEE TEMOCHE GARCIA
(MIEMBRO)


Blga. MARIBEL BAYLON CORITOMA
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

A mi hija Valeria Andrea
por motivarme cada día
y alegrar mi existencia.

A mis padres, Sonia y Jaime; y
a mis hermanos, Daniel y Manuel
por su amor, enseñanzas, confianza y apoyo.

A todas las personas que se involucraron
de manera práctica o intelectual en la
realización de este proyecto.

A todos mis maestros
por transmitirme la pasión
por la investigación científica.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC), por promover el desarrollo de la investigación científica en el Perú y por el apoyo económico brindado (Proyecto N° 211-2015-FONDECYT).

A mi familia, a mis hermanos Daniel y Manuel, pero sobre todo a mi madre, Sonia, por darme su confianza y apoyar mis decisiones. A Karen y Valeria por su apoyo incondicional y por compartir nuestro tiempo con este proyecto.

Especialmente agradezco a la profesora Martha Valdivia por aceptar asesorarme en el desarrollo de esta tesis y por todas las sugerencias y enseñanzas compartidas. Gracias por su amistad y confianza.

A los trabajadores de la empresa langostinera Marinasol S.A.C, al Ing. Juan Luzardo y al Blgo. Efraín Cayra, por brindarme su confianza para desarrollar el proyecto dentro de sus laboratorios y por permitirme aprender un poco más sobre la biotecnología en acuicultura ¡muchas gracias!

A la investigadora PhD. Thais Castelo por siempre responder a mis consultas y apoyarme durante la ejecución del proyecto.

A mis amigos con quienes estudié el pregrado, en particular a Frank, Manuel, Luis, Thonny, Pierr, Rodolfo, John y a todo Biología Base 11, gracias por su amistad y motivación.

Muchas gracias a todos.

ABREVIATURAS

DE: Desviación estándar

ANOVA: Análisis de varianza

K-W: Kruskal-Wallis

E: Espermátóforo

ME: Masa Espermática

DMSO: Dimetilsulfóxido.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

pH: Potencial de Hidrógeno.

μL: Microlitros.

rpm: Revoluciones por minuto.

°C: Grados Celsius.

%: Porcentaje.

Lv: *Litopenaeus vannamei*

SPF: Animales libres de patógenos.

g: gramos

cm: centímetros

TSV: Virus del Síndrome de Taura (TSV),

IHHNV: Virus de la Necrosis Infecciosa hipodérmica y hematopoyética

BP: Baculovirus penaei.

NHPV: Virus de la Necrosis Hepatopancreático

WSSV: Virus de la mancha blanca.

SRP: Linaje resistente a patógenos.

SSW: Agua de mar estéril.

SS Ca-free: Solución Salina libre de Calcio.

SR: Solución de Ringer.

SBP: Solución buffer fosfato.

VE: Viabilidad espermática.

ÍNDICE GENERAL

ACTA DE SUSTENTACIÓN.....	ii
CONTRACARÁTULA.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ABREVIATURAS.....	vi
ÍNDICE GENERAL.....	vii
INDICE DE TABLAS.....	x
INDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1. LANGOSTINOS EN EL PERÚ	6
2.1.1. Especie en Estudio: <i>Litopenaeus vannamei</i>	6
2.1.1.1. Taxonomía y Distribución	6
2.1.1.2. Acuicultura de <i>Litopenaeus vannamei</i> en el Perú	7
2.2. BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE <i>Litopenaeus vannamei</i>	8
2.2.1. Ciclo de Vida y Reproducción	8
2.2.2. Sistema Reprodutor en Machos de <i>Litopenaeus vannamei</i>	10
2.2.3. Estructura del Espermatozoide.....	12
2.3. PRINCIPIOS DE LA CRIOPRESERVACIÓN	13
2.3.1.1. Lesiones Celulares Crio Inducidas.....	14
2.3.1.2. Soluciones de Extensión	15
2.3.1.3. Agentes Crioprotectores (ACP)	17
2.3.1.4. Métodos de Criopreservación.....	18
2.3.1.5. Remoción de Crioprotectores.....	19
2.4. CALIDAD REPRODUCTIVA EN MACHOS DE <i>Litopenaeus vannamei</i>	19
2.4.1. Viabilidad e Integridad de Membrana Plasmática	20
3. ANTECEDENTES.....	22

4. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	29
4.1. HIPOTESIS	29
4.1.1. Hipótesis Alternativa.....	29
4.1.2. Hipótesis Nula	29
4.2. OBJETIVOS	29
4.2.1. Objetivo General	29
4.2.2. Objetivos Específicos	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
5.1. MATERIALES	30
5.1.1. Material Biológico	30
5.1.2. Material de Laboratorio.....	31
5.1.3. Equipos e Instrumentos	31
5.1.3.1. Mantenimiento de Reproductores	31
5.1.3.2. Viabilidad Espermática y Criopreservación.....	32
5.1.3.3. Soluciones y Reactivos.....	32
5.2. METODOLOGÍA	32
5.2.1. Manejo de Reproductores	32
5.2.2. Colecta de las Estructuras Reproductivas.....	34
5.2.2.1. Espermátforo	34
5.2.2.2. Masa Espermática	35
5.2.3. Diseño Experimental.....	35
5.2.4. Procesamiento y Evaluación de la Viabilidad Espermática	38
5.2.4.1. Evaluación de la Viabilidad Espermática (VE) mediante Tinción vital con Eosina-Nigrosina.....	38
5.2.4.2. Evaluación del Peso de los Espermátforos.....	39
5.2.5. Formulación de Protocolos de Criopreservación.....	40
5.2.5.1. Evaluación y Preparación de las Soluciones de Extensión	40
5.2.5.2. Evaluación de Crioprotectores Permeables (ACPp), Concentración y Tiempo de Exposición.	42
5.2.5.3. Evaluación de Crioprotectores No Permeables (ACPnp)	43
5.2.5.4. Primera Evaluación de las Soluciones Crioprotectoras Post-Vitrificación	44
5.2.5.5. Suplementación con Soluciones Complejas y Segunda Evaluación de las Soluciones Crioprotectoras Post-Vitrificación.....	44
5.2.6. Método de Congelamiento - Vitricación	46
5.2.7. Protocolo de Descongelamiento y Enjuague	46

5.2.8. Inseminación artificial (IA) con Espermatozoides de <i>Litopenaeus vannamei</i> Criopreservados.....	47
5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	49
6. RESULTADOS	50
6.1. Extracción de Material Espermático.....	50
6.2. Protocolos de Criopreservación para el ESPERMATÓFORO (E)	50
6.2.1. Determinación de la Solución de Extensión	50
6.2.2. Determinación de las Combinaciones de Crioprotector Permeable, Concentración y Tiempo de Exposición.....	52
6.2.3. Determinación del Crioprotector No Permeable (ACPnp).....	58
6.2.3.1. Evaluación Post-Vitrificación.....	60
6.2.4. Determinación de la Solución Compleja (SC) Post-Vitrificación	62
6.3. Protocolo de Criopreservación para la MASA ESPERMÁTICA (ME).....	65
6.3.1. Determinación de la Solución de Extensión	65
6.3.2. Determinación de las Combinaciones de Crioprotector Permeable, Concentración y Tiempo de Exposición.....	66
6.3.3. Determinación del Crioprotector No Permeable (ACPnp).....	71
6.3.3.1. Evaluación Post-Vitrificación.....	74
6.3.4. Determinación de la Solución Compleja (SC) Post-Vitrificación	75
6.4. Inseminación artificial (IA) con Esperma Criopreservada	79
6.4.1. Conteo Volumétrico de Embriones.....	79
6.4.2. Conteo Volumétrico de Nauplios	80
6.4.3. Porcentaje de Eclosión de Nauplios.....	81
7. DISCUSIÓN	82
8. CONCLUSIONES	94
9. RECOMENDACIONES	95
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
11. ANEXOS	115
11.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	115
11.1.1. Determinación de las Soluciones de Extensión	115
11.1.2. Determinación de las Combinaciones de Crioprotector Permeable, Concentración y Tiempo de Exposición.....	119
11.1.3. Determinación del Crioprotector No Permeable	135
11.1.4. Evaluación Post-Vitrificación	139
11.1.5. Determinación de la Solución compleja Post-Vitrificación	142
11.2. GALERÍA FOTOGRÁFICA.....	148

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Investigaciones en almacenamiento en frío de espermatozoides de <i>Litopenaeus vannamei</i> .	23
Tabla 2. Investigaciones en criopreservación de gametos masculinos en langostinos peneidos.	25
Tabla 3. Composición de la Solución Salina libre de Calcio (SS Ca-free).	41
Tabla 4. Composición de la solución de Ringer (SR).	41
Tabla 5. Composición de la Solución Buffer Fosfato (SBP).	41
Tabla 6. Concentraciones de los crioprotectores no permeables* evaluados para el espermatóforo y la masa espermática.	44
Tabla 7. Diseño experimental del ensayo de inseminación artificial (IA).	48
Tabla 8. Porcentaje de espermatozoides viables (promedio \pm desviación estándar) en los espermatóforos de <i>Litopenaeus vannamei</i> almacenados durante 12 horas en diferentes medios de extensión.	51
Tabla 9. Porcentaje de espermatozoides viables (promedio \pm desviación estándar) en los espermatóforos de <i>Litopenaeus vannamei</i> evaluados con Metanol (MeOH).	53
Tabla 10. Porcentaje de espermatozoides viables (promedio \pm desviación estándar) en los espermatóforos de <i>Litopenaeus vannamei</i> evaluados con dimetilsulfóxido (DMSO).	54
Tabla 11. Porcentaje de espermatozoides viables (promedio \pm desviación estándar) en los espermatóforos de <i>Litopenaeus vannamei</i> evaluados con dicloruro de magnesio (MgCl ₂).	56
Tabla 12. Porcentaje de espermatozoides viables (promedio \pm desviación estándar) en los espermatóforos de <i>Litopenaeus vannamei</i> evaluados con 2-propanol.	57
Tabla 13. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de la citotoxicidad de las soluciones crioprotectoras (ACPp + ACPnp) para los espermatóforos de <i>Litopenaeus vannamei</i> (promedio \pm DE).	59
Tabla 14. Porcentajes de viabilidad espermática post vitrificación de las soluciones crioprotectoras (ACPp + ACPnp) para los espermatóforos de <i>Litopenaeus vannamei</i> (promedio \pm DE).	61
Tabla 15. Porcentajes de viabilidad espermática post vitrificación de las soluciones crioprotectoras (ACPp + ACPnp + SC) para los espermatóforos de <i>Litopenaeus vannamei</i> (promedio \pm DE).	63

Tabla 16. Porcentaje de espermatozoides viables (promedio \pm desviación estándar) en las masas espermáticas de <i>Litopenaeus vannamei</i> almacenados durante 12 horas en diferentes medios de extensión.....	65
Tabla 17. Porcentaje de espermatozoides viables (promedio \pm desviación estándar) en la masa espermática de <i>Litopenaeus vannamei</i> evaluados con metanol (MeOH).....	67
Tabla 18. Porcentaje de espermatozoides viables (promedio \pm desviación estándar) en la masa espermática de <i>Litopenaeus vannamei</i> evaluados con dimetilsulfóxido (DMSO)....	68
Tabla 19. Porcentaje de espermatozoides viables (promedio \pm desviación estándar) en la masa espermática de <i>Litopenaeus vannamei</i> evaluados con dicloruro de magnesio (MgCL ₂).....	69
Tabla 20. Porcentaje de espermatozoides viables (promedio \pm desviación estándar) en la masa espermática de <i>Litopenaeus vannamei</i> evaluados con 2-propanol.....	70
Tabla 21. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de la citotoxicidad de las soluciones crioprotectoras (ACPp + ACPnp) para las masas espermáticas de <i>Litopenaeus vannamei</i> (promedio \pm DE).....	73
Tabla 22. Porcentajes de viabilidad espermática post-vitrificación de las soluciones crioprotectoras (ACPp + ACPnp) para las masas espermáticas de <i>Litopenaeus vannamei</i> (promedio \pm DE).....	75
Tabla 23. Porcentajes de viabilidad espermática post vitrificación de las soluciones crioprotectoras (ACPp + ACPnp + SC) para los espermatóforos de <i>Litopenaeus vannamei</i> (promedio \pm DE).....	77
Tabla 24. Número de embriones por tratamiento durante la inseminación artificial (IA)....	79
Tabla 25. Numero de nauplios eclosionados por tratamiento durante la inseminación artificial (IA).	80
Tabla 26. Porcentajes de eclosión por tratamiento durante la inseminación artificial (IA).	81

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de recursos hidrobiológicos procedentes de la acuicultura según especie para el año 2015.	2
Figura 2. Exportación de recursos hidrobiológicos procedentes de la acuicultura según especie para el año 2015.	7
Figura 3. Ciclo de vida del langostino de la familia penaeidae (Shrimp news international, n.d.).....	9
Figura 4. Ultraestructura del espermatozoide de <i>Litopenaeus vannamei</i> . Escala de la barra de 1 μ m. Obsérvese la espina (SP), la cápsula acrosomal (ACC) subacrosoma (SC), malla fibrilar (FM) las partículas citoplasmáticas (CP). (tomado de Alfaro 2013).....	12
Figura 5. Etapas de un protocolo de criopreservación de espermatozoides (modificado de Suarez 2014).....	14
Figura 6. Área de Líneas Puras del Centro de Investigación y Desarrollo de Post-larvas de Langostino <i>Litopenaeus vannamei</i> de la empresa langostinera MarinaSol S.A.C	31
Figura 7. Ubicación geográfica del “Centro de Investigación y Desarrollo de Post-larvas de Langostino <i>Litopenaeus vannamei</i> - MarinaSol S.A.C., situado en el departamento de Tumbes, provincia de contralmirante Villar, distrito de Canoas de Punta Sal, caleta de Punta Mero.....	33
Figura 8. Flujograma de trabajo para la formulación de protocolos de criopreservación de gametos masculinos en <i>Litopenaeus vannamei</i>	37
Figura 9. Efecto de la solución de extensión sobre la viabilidad espermática del espermatóforo de <i>Litopenaeus vannamei</i> , transcurridos 12 horas de almacenamiento a temperatura ambiente.	51
Figura 10. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de la citotoxicidad del metanol (MeOH) sobre los espermatóforos de <i>Litopenaeus vannamei</i> (promedio \pm DE) ($p < 0.05$).....	53
Figura 11. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de la citotoxicidad del dimetilsulfóxido sobre los espermatóforos de <i>Litopenaeus vannamei</i> (promedio \pm DE) ($p < 0.05$).....	55
Figura 12. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de la citotoxicidad del dicloruro de magnesio sobre los espermatóforos de <i>Litopenaeus vannamei</i> (promedio \pm DE) ($p < 0.05$).	56

Figura 13. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de la citotoxicidad del 2-propanol sobre los espermátóforos de <i>Litopenaeus vannamei</i> (promedio \pm DE) ($p < 0.05$).	57
Figura 14. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de citotoxicidad de las soluciones crioprotectoras (ACPp +ACPnp) para los espermátóforos de <i>Litopenaeus vannamei</i> (promedio \pm DE).....	60
Figura 15. Viabilidad espermática en el espermátóforo de <i>Litopenaeus vannamei</i> después de la vitrificación con soluciones crioprotectoras (ACPp +ACPnp).	61
Figura 16. Viabilidad espermática en el espermátóforo de <i>Litopenaeus vannamei</i> después de la vitrificación con soluciones crioprotectoras (ACPp + ACPnp +SC).	64
Figura 17. Efecto de la solución de extensión sobre la viabilidad espermática de la masa espermática de <i>Litopenaeus vannamei</i> , transcurridos 12 horas de almacenamiento a temperatura ambiente.	66
Figura 18. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de la citotoxicidad del metanol sobre la masa espermática de <i>Litopenaeus vannamei</i> (promedio \pm DE) ($p < 0.05$).	67
Figura 19. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de la citotoxicidad del dimetilsulfóxido sobre la masa espermática de <i>Litopenaeus vannamei</i> (promedio \pm DE) ($p < 0.05$).....	68
Figura 20. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de la citotoxicidad del dicloruro de magnesio sobre la masa espermática de <i>Litopenaeus vannamei</i> (promedio \pm DE) ($p < 0.05$).	70
Figura 21. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de la citotoxicidad del 2-propanol sobre la masa espermática de <i>Litopenaeus vannamei</i> (promedio \pm DE) ($p < 0.05$).	71
Figura 22. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de citotoxicidad de las soluciones crioprotectoras (ACPp +ACPnp) para las masas espermáticas de <i>Litopenaeus vannamei</i> (promedio \pm DE).....	74
Figura 23. Viabilidad espermática en la masa espermática de <i>Litopenaeus vannamei</i> después de la vitrificación con soluciones crioprotectoras (ACPp +ACPnp).	75
Figura 24. Viabilidad espermática en la Masa espermática de <i>Litopenaeus vannamei</i> después de la vitrificación con soluciones crioprotectoras (ACPp + ACPnp +SC).	78
Figura 25. Fotografías de la preparación de soluciones crioprotectoras y colorantes eosina-nigrosina en el laboratorio de Biología Molecular-Incabiotech S.A.C.	148

Figura 26. Fotografías del proceso de extracción y criopreservación del espermatóforo y la masa espermática de <i>Litopenaeus vannamei</i> en el laboratorio de Biología Molecular del CIDPL-MarinaSol S.A.....	149
Figura 27. Fotografías del proceso de descongelamiento y evaluación de espermatozoides de <i>Litopenaeus vannamei</i> en el laboratorio de Biología Molecular del CIDPL-MarinaSol S.A.....	149
Figura 28. Fotografías de la evaluación de la viabilidad espermática de <i>Litopenaeus vannamei</i> con la técnica de tinción eosina-nigrosina en el laboratorio de Biología Molecular del CIDPL-MarinaSol S.A.....	149
Figura 29. Fotografías del proceso de inseminación artificial (IA) y eclosión de larvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> en el área de Líneas Puras del CIDPL-MarinaSol S.A.	149

RESUMEN

Aunque el cultivo de langostino blanco genera cuantiosas divisas en el norte del Perú, la aplicación de tecnologías como la criopreservación, la cual conlleva múltiples ventajas en relación al mejoramiento genético y la conservación de la biodiversidad, aún no han sido implementadas.

El objetivo del presente estudio fue desarrollar protocolos optimizados de vitrificación para la criopreservación el espermatóforo y la masa espermática de *Litopenaeus vannamei*. Inicialmente se evaluó la sobrevivencia espermática en tres soluciones de extensión: solución salina libre de calcio (SS Ca-free), solución de Ringer (SR) y solución buffer fosfato (SBP), con la finalidad de obtener el mejor medio dilutor. Para la formulación de la solución crioprotectora se evaluó la citotoxicidad de 4 crioprotectores permeables: dimetilsulfóxido (DMSO), metanol (MeOH), 2-propanol y dicloruro de magnesio ($MgCl_2$) a las concentraciones de 10, 15, 20 y 30% (v/v) durante 15, 30 y 60 min de exposición; 4 crioprotectores no permeables: leche descremada (10%), polietilenglicol (5%), manitol (5%) y sacarosa (0.2 M); y la suplementación con soluciones complejas: yema de huevo, extracto crudo de *Aloe vera*, suero bovino fetal y suero de ternero al 10%. La viabilidad espermática fue determinada mediante la técnica de tinción vital con eosina-nigrosina.

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que la vitrificación de espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* es eficiente considerando que las soluciones compuestas por SS Ca-free, $MgCl_2$ 15%, extracto de *Aloe vera* 10%, leche descremada 10% y 5%, durante 30 y 15 min de exposición resultaron en porcentajes de viabilidad espermática post-descongelamiento de $85.12 \pm 4.69\%$ para el espermatóforo y $72.24 \pm 17.50\%$ para la masa espermática, respectivamente. Adicionalmente, la fertilidad de los espermatozoides criopreservados con extracto de *Aloe vera* fue confirmada mediante inseminación artificial (IA), observándose individuos normales hasta la fase de nauplio. En la presente investigación se reporta por primera vez el uso del extracto de *Aloe vera* como crioprotector en la formulación de protocolos de criopreservación de crustáceos. Los protocolos de criopreservación descritos en esta tesis son los primeros reportados para langostinos en el Perú.

Palabras claves: *Litopenaeus vannamei*, vitrificación, espermatóforo, masa espermática, inseminación artificial (IA), *Aloe vera*.

ABSTRACT

Although white shrimp's aquaculture produces great foreign exchange in northern of Peru, application of technologies such as cryopreservation, which carry multiple advantages in genetic improvement and biodiversity conservation, have not yet been implemented.

The aim of this study was developing optimized vitrification protocols for the cryopreservation of the spermatophore and the sperm mass of *Litopenaeus vannamei*. Firstly, sperm survival was evaluated in three extension solutions: calcium-free saline solution (SS Ca-free), Ringer's solution (SR) and phosphate buffer solution (SBP), in order to obtain the best dilutor medium. For the formulation of the cryoprotective solution, the cytotoxicity of 4 permeable cryoprotectants was evaluated: dimethylsulfoxide (DMSO), methanol (MeOH), 2-propanol and magnesium dichloride (MgCl₂) at the concentrations of 10, 15, 20 and 30% (v / v) during 15, 30 and 60 min of exposure; 4 non-permeable cryoprotectants: skim milk (10%), polyethylene glycol (5%), mannitol (5%) and sucrose (0.2 M); and supplementation with complex solutions at 10%: egg yolk, crude extract of *Aloe vera*, fetal bovine serum and calf serum. Sperm viability was determined by the vital staining technique with eosin-nigrosin.

According to the results obtained, it is concluded that vitrification of *Litopenaeus vannamei* sperm is efficient considering that solutions composed by SS Ca-free, MgCl₂ 15%, extract of *Aloe vera* 10%, skim milk 10% and 5%, during 30 and 15 min of exposure resulted in high percentages of sperm viability post-thawing, $85.12 \pm 4.69\%$ for spermatophore and $72.24 \pm 17.50\%$ for sperm mass, respectively. Furthermore, fertility of cryopreserved sperm with extract of *Aloe vera* was confirmed by artificial insemination (AI), by detecting healthy individuals until the nauplii phase. In the present investigation, the use of extract of *Aloe vera* as cryoprotectant in the formulation of crustacean cryopreservation protocols is reported for the first time. The cryopreservation protocols described in this thesis are the first reported for shrimp in Peru.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, vitrification, spermatophore, Sperm mass, artificial insemination (AI), *Aloe vera*.

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura, definida como el cultivo de recurso hidrobiológicos, principalmente de peces, crustáceos, moluscos y plantas acuícolas (Food and Agriculture Organization [FAO], 2016), es el sector de mayor desarrollo en aspectos de producción, sanidad, nutrición, así como en la diversificación de especies, logrando ser considerada actualmente como la actividad económica con mayor potencial para la seguridad alimentaria de los pueblos en todo el mundo (High Level Panel of Experts [HLPE], 2014).

El “langostino blanco” *Litopenaeus vannamei* es un decápodo bentónico nativo de las aguas tropicales del océano Pacífico, su cultivo inició en Centroamérica en la década de los setenta y actualmente se encuentra extendido en Asia y América (Briggs et al., 2004).

La acuicultura del langostino blanco cuenta con un acervo tecnológico que incluye la reproducción en laboratorio (Gutiérrez et al., 2014) y la adaptación a sistemas de agua dulce (Miranda et al., 2010), sin embargo, solo en las últimas décadas se viene desarrollando investigación en el área de la biotecnología para la mejora genética.

En el Perú, la producción acuícola se encuentra principalmente representada por tres especies: *Oncorhynchus mykiss* la “trucha arcoíris”, *Argopecten purpuratus* la “concha de abanico”) y *Litopenaeus vannamei* el “langostino blanco”, estos recursos hidrobiológicos en conjunto alcanzaron el 94.71 % de la producción acuícola total durante el año 2015 (Figura 1) (Ministerio de la Producción [PRODUCE], 2015).

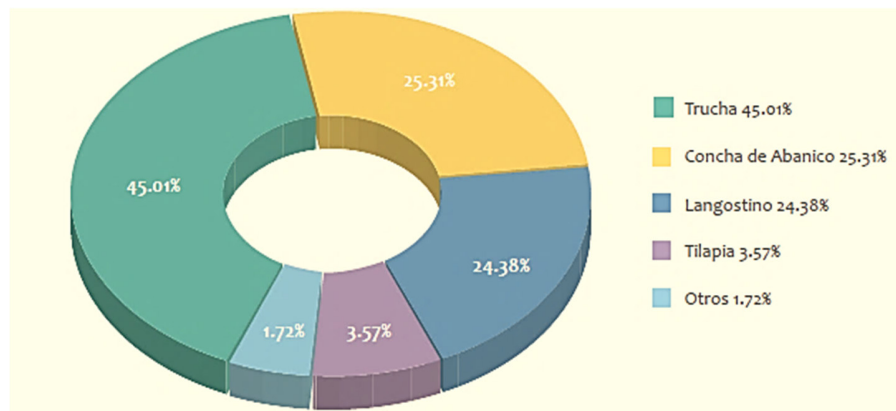


Figura 1. Producción de recursos hidrobiológicos procedentes de la acuicultura según especie para el año 2015.

La pesquería del langostino blanco en el norte del Perú se sustenta en la extracción de la reserva silvestre de las costas de la región Tumbes y Piura, sin embargo, debido a la disminución sostenida de los desembarques, el mayor volumen de producción proviene de la cosecha de la industria acuícola, la cual se desarrolla en su mayoría en las zonas próximas a los manglares de la región Tumbes (81.18%) (PRODUCE, 2015).

El principal problema del cultivo de *Litopenaeus vannamei* a nivel mundial radica en el control de las diversas enfermedades que afectan a esta especie, las cuales son causadas principalmente por agentes infecciosos de naturaleza viral y bacteriana (Morales-Covarrubias et al., 2011). Los brotes de infección en los campos de producción generan altas tasas de mortalidad afectando no solo a la población en cultivo sino también al ecosistema ya que pueden propagarse a las poblaciones nativas de crustáceos (Briggs et al., 2004). En el continente americano, se han reportado cuatro principales epizootias virales para el langostino blanco: Virus del Síndrome de Taura (TSV), Virus de la Necrosis Infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV), Baculovirus penaei (BP) y el virus de la mancha blanca (WSSV) (Robles-Mancilla, 2006). Para solucionar esta problemática, las investigaciones se han enfocado en la formación de linajes resistentes a patógenos

(SRP) en distintas regiones del mundo, generando así poblaciones resistentes contra el WSSV (Maldonado, 2003; Guertler, 2010; Pérez et al., 2002), IHNV (Motte et al., 2003) y TSV (Veloso et al., 2011). Sin embargo, hasta la actualidad, el desarrollo de líneas multirresistentes aún no se ha concretado debido a la baja tasa de sobrevivencia a una doble infección viral.

En este contexto, el establecimiento de un protocolo de criopreservación permitiría el cruce de linajes resistentes geográficamente separados, además de reducir el riesgo de transmisión de patógenos y evitar la depresión endogámica producida en la descendencia de linajes consanguíneos (Mendoza et al., 2013).

Durante finales de la década de los noventa, la enfermedad de “la mancha blanca” ocasionó una mortandad del 90% en las langostineras de Tumbes (Zafra et al., 2012). Recientemente se ha reportado la prevalencia del Virus de la Necrosis Hepatopancreática (NHPB) (0.62%), IHNV (0.31%), BP (1.61%) y WSV (2.75%) en langostinos silvestres de Tumbes (Alfaro et al., 2010). Otra investigación reporta la introducción de cuatro patógenos virales (IHNV, BP, TSV, y NHPB) a través de la importación de post larvas desde Ecuador, siendo el patógeno más frecuente el IHNV con un 9.60% para el año 2009, incrementándose a 16.79% para el año 2010 (Guevara & Alfaro, 2012).

El cultivo de *Litopenaeus vannamei* en el Perú es una actividad de importancia económica que requiere del aporte científico para garantizar su sostenibilidad y crecimiento (Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica [SINACYT], 2006), de manera preponderante en la implementación de tecnologías para prevenir la mortalidad causada por las múltiples enfermedades virales que afectan al langostino, ya que los efectos de una epizootia devendrían en grandes pérdidas económicas, causando un impacto social directo sobre los puestos de trabajo ligados al cultivo de langostino.

La implementación de técnicas de criopreservación de gametos permite el desarrollo de tecnologías como la reproducción asistida, la conservación de recursos genéticos y la

mejora genética de especies. En la industria acuícola, la aplicación de la criopreservación genera ventajas como: la sincronización de épocas reproductivas, el suministro permanente de esperma de calidad, la producción selectiva de organismos resistentes, la reducción en la transmisión de patógenos y el intercambio de material genético entre factorías distantes (Lichtenstein, 2009), evitando la pérdida del acervo genético y la homocigosis generada por la endogamia (Martínez et al., 2017). Asimismo, impulsaría la formación de líneas resistentes a distintas infecciones virales mediante el cruce de linajes con programas de mejoramiento genético desarrollados en diferentes países.

El intercambio de material genético criopreservado conlleva un impacto positivo sobre las poblaciones nativas de crustáceos, debido a que el transporte de gametos congelados permite un mayor control sanitario, disminuyendo la propagación de enfermedades compartidas entre los crustáceos tales como el virus de la mancha blanca (Hameed et al., 2003). Por otra parte, el impacto de tecnologías de criopreservación en los centros de cultivo permite reducir el costo de producción en lo referente al mantenimiento de reproductores (Gwo, 2000). Otra ventaja es la disponibilidad continua de semen de calidad que ofrece esta técnica, la cual permitiría una sincronía reproductiva y un control coordinado de la obtención de post larvas, lo que podría ser aprovechado para el establecimiento de programas reproductivos sistematizados.

En el aspecto de la economía nacional, el desarrollo de esta tecnología le permitiría a la industria peruana posicionarse en el inexplorado mercado de la venta de esperma de langostinos genéticamente mejorados, generando así una tecnología nacional innovadora y con diversas perspectivas de aplicación.

Por lo antes mencionado, el presente trabajo de investigación tuvo por finalidad formular protocolos de criopreservación óptimos para el espermatóforo y la masa espermática de *Litopenaeus vannamei* empleando el método de la vitrificación, con este propósito se evaluó la viabilidad espermática frente al efecto de la solución de extensión, los

crioprotectores permeables a diferentes niveles de concentración y periodos de exposición, el efecto de los crioprotectores no permeables y adición de soluciones complejas. Esta investigación se desarrolló como parte del proyecto: "Implementación y optimización de las tecnologías de criopreservación y transfección de gametos masculinos del langostino *Litopenaeus vannamei*" Proyecto N° 211-2015-FONDECYT.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. LANGOSTINOS EN EL PERÚ

El Perú tiene registrados 10 géneros y 22 especies dentro de la Superfamilia Penaeoidea, todos ellos conocidos comúnmente como “langostinos” (Méndez, 1981). Dentro de la familia Penaeidae, la especie de mayor importancia comercial para el Perú, *Litopenaeus vannamei*, pertenece al género *Litopenaeus*, conformado por el grupo de langostinos con telico “abierto” o sin receptáculos seminales (Alfaro-Montoya, 2010).

2.1.1. Especie en Estudio: *Litopenaeus vannamei*

2.1.1.1. Taxonomía y Distribución

Reino	Animalia
Phylum	Arthropoda
Clase	Malacostraca
Orden	Decapoda
Familia	Penaeidae
Género	<i>Litopenaeus</i>
Especie	<i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931)

L. vannamei es un crustáceo perteneciente a la familia de los peneidos cuya distribución abarca desde Sonora, en la costa norte de México, hasta Tumbes, en la costa norte del Perú (Moscoso, 2014).

Hasta antes de la revisión de la familia Penaeidae, realizada por Pérez-Farfante & Kensley en el año 1997, *Litopenaeus* era considerado como un subgénero del género *Penaeus* (Citado en Michel, 2002, p.22).

2.1.1.2. Acuicultura de *Litopenaeus vannamei* en el Perú

El cultivo de langostinos en el Perú constituye la denominada acuicultura del desierto, ya que se desarrolla en la desértica costa norte del país, en los departamentos de Tumbes y Piura, siendo factible su implementación en la región Lambayeque (Talavera et al., 1999). Esta actividad se inició en la década de los setenta, representando durante muchos años la principal actividad de la acuicultura peruana, y a pesar de que actualmente se ubique en el tercer puesto de la producción acuícola nacional, su cultivo se ha ido incrementando debido a la demanda mundial, la rentabilidad de cultivo y la generación de divisas (Burgos, 2012). La producción nacional de langostinos está destinada principalmente a la exportación, para el año 2015, esta ocupó el tercer lugar de la producción acuícola con un volumen de 22 017,11 toneladas métricas brutas, constituyendo el 53.60% de la exportación de recursos hidrobiológicos provenientes de la acuicultura según especie (Figura 2) (PRODUCE, 2015).

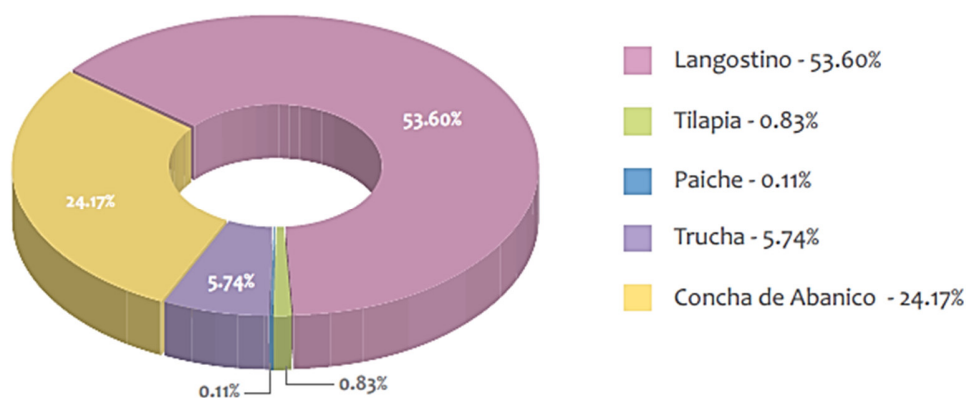


Figura 2. Exportación de recursos hidrobiológicos procedentes de la acuicultura según especie para el año 2015.

Dentro de los principales países destino de esta especie destacan: Estados Unidos, España y Francia. En contraste con el consumo interno, el langostino represento únicamente el 9.54% de la venta interna de los recursos hidrobiológicos cultivados (PRODUCE, 2015).

2.2. BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *Litopenaeus vannamei*

2.2.1. Ciclo de Vida y Reproducción

Los langostinos son crustáceos dioicos con un notorio dimorfismo sexual, los machos presentan un órgano copulador externo (petasma) formado por la fusión del primer par de apéndices nadadores (pleópodos) mientras que las hembras presentan un receptáculo seminal (telico) ubicado entre la base del 4to y 5to par de apéndices caminadores (pereiópodos) (Michel, 2002). La presencia del petasma en los machos tiene como función la transferencia del espermátforo al telico de la hembra (Misamore & Browdy, 1996).

Litopenaeus vannamei habita en aguas tropicales con temperaturas superiores a los 25 °C, la etapa adulta se desarrolla en la plataforma continental, mientras que la fase juvenil transcurre en estuarios y lagunas costeras a salinidades inferiores (Briggs et al., 2004).

El proceso de copula puede darse a cualquier hora del día, la etología del proceso inicia cuando el macho se ubica en posición ventral por debajo de la hembra y deposita los dos espermátforos en el telico de la hembra. Los espermátforos, que están provistos de una sustancia pegajosa necesaria para la adhesión al telico, liberan gradualmente la masa espermática durante el desove dando lugar a la fecundación (Alfaro et al., 2007; Michel, 2002). Sin embargo, el desove no es un proceso inmediato a la cópula, este ocurre alrededor de la medianoche mientras tanto los espermátforos permanecen adheridos al telico durante todo este intervalo de tiempo. La ontogénesis del langostino continua inmediatamente y las ovas fecundadas eclosionan en larvas después de 14 a 20 horas. La etapa larval incluye 11 estadios pasando por 5 estadios de nauplio, 3 de protozoa y 3 de mysis. Después de 21 días desde el desove, las larvas alcanzan la etapa de post-larva (Feijó, 2009). Las post-larvas dejan atrás su forma de vida planctónica y se desarrollan rápidamente en aguas costeras pasando por la etapa de juveniles hasta convertirse en adultos para finalmente migrar a las áreas de reproducción en el mar, donde se reinicia el

ciclo (Michel, 2002) (Figura 3).

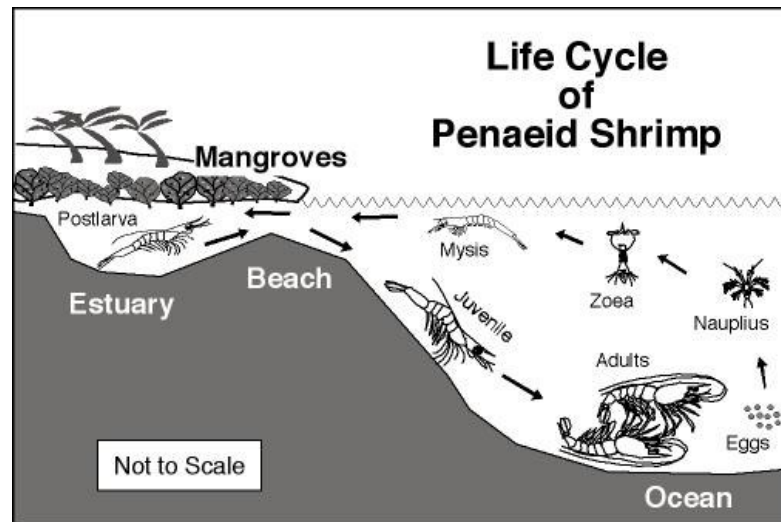


Figura 3. Ciclo de vida del langostino de la familia penaeidae (Shrimp news international, n.d.).

Los machos de *Litopenaeus vannamei* de 12 meses (38 g) provenientes de factorías acuícolas muestran una mejor calidad de espermátforo que los silvestres, con un conteo de 4.6 millones de espermatozoides y un porcentaje de anomalías espermáticas de 17.4% (Ceballos-Vázquez et al., 2003). En tanto que, las hembras de entre 8 a 10 meses con un peso aproximado de 28 g se reproducen eficientemente (FAO, 2016). Durante la etapa reproductiva las hembras silvestres liberan de 100 000 a 500 000 ovocitos por desove, valores superiores a los reportados en cultivo, los cuales oscilan entre 100 000 y 220 000 (Hernández et al., 2012). Cada hembra puede desovar múltiples veces a lo largo de su vida, no obstante, los centros de producción de post-larvas emplean hembras maduras únicamente durante 2 o 3 meses debido a que tiempo después la calidad reproductiva decae (Alfaro-Montoya, 2001).

La reproducción controlada en los laboratorios productores de larvas se fundamenta en la aplicación de técnicas de inducción de la madurez en las hembras mediante la ablación unilateral del pedúnculo ocular, esta técnica consiste en cortar el pedúnculo ocular y cauterizar inmediatamente la herida, la base biológica de la efectividad de esta técnica es

la eliminación del mayor centro de control neuroendocrino ubicado en el órgano ocular del langostino, este complejo es conocido como órgano x-glándula sinusal y se encarga de sintetizar y almacenar las hormonas que controlan el proceso reproductivo (Alfaro-Montoya, 2010), al suprimir este complejo, los inhibidores del proceso reproductivo disminuyen favoreciendo la madurez gonadal. Aunque esta técnica es ampliamente utilizada en los reproductores hembras, diversos estudios demuestran que también mejora la calidad de los espermátóforos en los langostinos machos (Alfaro-Montoya, 2010; Vásquez et al., 2013).

El conocimiento de la biología y el comportamiento reproductivo permiten simular los requerimientos de esta especie en los centros de producción, mejorando así las técnicas de reproducción inducida. En condiciones de cultivo, los langostinos reproductores deben ser mantenidos a una densidad de 5 langostinos/m² con una proporción sexual de 1:1, en agua de mar a una salinidad promedio de 30 ppm y un fotoperiodo natural de 12 horas luz: 12 horas oscuridad. La alimentación se debe realizar tres veces al día (a las 09:00 am, 02:00 pm y 08:00 pm) con dieta de maduración comercial (5% de la biomasa) y alimento fresco compuesto de mitílidos, poliquetos, artemia y calamares frescos (18% de la biomasa). La remoción de los residuos orgánicos se debe realizar diariamente y el recambio de agua debe ser constante. Los parámetros de la calidad de agua establecidos para un óptimo desarrollo son: Temperatura de 28°C, pH 7.5, y Oxígeno disuelto 5 mg/L. (Husien & Aguillón, 2008). Durante la época de apareamiento la alimentación debe ser suplementada con poliquetos, ya que por su alto contenido de lípidos estimula el desove en las hembras y aumenta la cópula en los machos.

2.2.2. Sistema Reproductor en Machos de *Litopenaeus vannamei*

El sistema reproductor en machos del género *Litopenaeus* está conformado por un par de testículos, cada uno compuestos por túbulos seminíferos plegados; y los vasos

deferentes, subdivididos en: ducto deferente proximal, ducto medio ascendente y descendente, ducto distal y ámpulas terminales (Alfaro-Montoya, 2013).

Según el modelo descrito por Alfaro-Montoya et al. (2016), la maduración de los espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* se desarrolla en tres niveles independientes: la maduración testicular, la maduración en los vasos deferentes y la maduración en los espermatóforos. A nivel de los túbulos seminíferos se desarrolla la espermatogénesis con la diferenciación de la espermatogonia en espermatidas tardías (sin espinas). A nivel de los vasos deferentes, las espermatidas tardías maduran hasta desarrollar la espina acrosomal, durante el trayecto a través de los ductos deferentes, los espermatozoides dispersos son empaquetados con una variedad de secreciones ricas en polisacáridos y proteínas que mantienen la viabilidad, conformando así la masa espermática (Bambozzi, 2013). Finalmente, los espermatozoides son almacenados en un par de estructuras especializadas denominadas espermatóforos. Sin embargo, a pesar de que los espermatozoides se observan totalmente formados en los espermatóforos, la maduración final y la capacitación suceden de 3 a 4 horas después de la adhesión del espermatóforo sobre el telico de la hembra (Alfaro-Montoya et al., 2016).

Los espermatóforos de *Litopenaeus vannamei* están rodeados de una sustancia glutinosa que le permite adherirse al telico de la hembra, poseen una forma ligeramente ovalada más ancha en su parte distal, también conocido como ámpula. La formación de los espermatóforos inicia en los vasos deferentes con la síntesis de las capas primaria y secundaria, sin embargo, el ensamblaje de las unidades que lo conforman (plato dorsal, las alas y la masa glutinosa y adhesiva) ocurre en las cámaras de las ámpulas terminales (Alfaro-Montoya, 2010).

La formación de los espermatóforos es dependiente de los ciclos de muda, renovándose aproximadamente cada 2 semanas y se sabe que la cantidad y calidad espermática no varían entre las renovaciones consecutivas (Cabrita et al., 2008). La producción de

espermatóforos es continua por lo que cuando no se da la cópula, estos se degradan mediante un proceso de melanización (Alfaro-Montoya, 2010).

2.2.3. Estructura del Espermatozoide

El espermatozoide es una célula especializada cuya función principal es el transporte de información genética que contribuye a la formación de un nuevo individuo, en la naturaleza estas células poseen diversas morfologías y peculiaridades dentro de cada taxón. Los espermatozoides de los crustáceos decápodos tienen como principal característica la carencia de movilidad y los langostinos del género *Litopenaeus* no son la excepción, por esta razón la integridad estructural y funcional de la membrana es empleada como característica de la viabilidad celular (Alfaro-Montoya, 2010).

Los espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* poseen forma esférica y tiene un tamaño de 3 a 4 micras, carecen de flagelos y presentan en su estructura 3 regiones anatómicas: el acrosoma (espina no móvil y cápsula acrosomal), sub-acrosoma (malla fibrilar) y el núcleo (Figura 4) (Alfaro-Montoya, 2013). La unión entre el espermatozoide y el ovocito ocurre a través de la espina, dando lugar a la reacción acrosómica y a la fertilización.

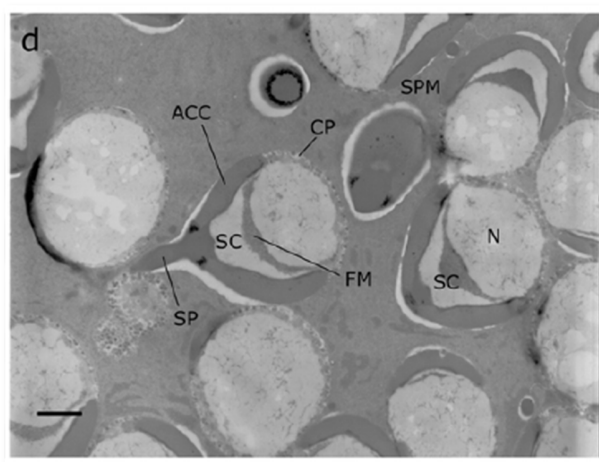


Figura 4. Ultraestructura del espermatozoide de *Litopenaeus vannamei*. Escala de la barra de 1 μ m. Obsérvese la espina (SP), la cápsula acrosomal (ACC) subacrosoma (SC), malla fibrilar (FM) las partículas citoplasmáticas (CP). (tomado de Alfaro 2013).

2.3. PRINCIPIOS DE LA CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación es el conjunto de técnicas y metodologías que tienen como propósito el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad de material biológico a temperaturas criogénicas por un tiempo ilimitado. Durante el congelamiento se disminuye el metabolismo celular hasta detener las reacciones bioquímicas para posteriormente reactivarlas (Lichtenstein, 2009). Dependiendo del tipo de células o tejidos a criopreservar, la respuesta a la criopreservación varía significativamente resultando en un conjunto de condiciones definidas, de hecho, es más sencillo criopreservar células que tejidos debido a la complejidad de la composición de estos últimos (Pegg, 2007).

La criopreservación de espermatozoides involucra diferentes cambios biofísicos y químicos que pueden originar una disminución en la sobrevivencia a causa del choque térmico y la formación de cristales durante el congelamiento y descongelamiento, por ello el material biológico es criopreservado en soluciones crioprotectoras que proveen un medio equilibrado y regulan el proceso de deshidratación celular (Robles et al., 2005).

De acuerdo con Tiersch & Mazik (2000) los principales pasos para la formulación de un protocolo de criopreservación incluyen la determinación de la solución de extensión, los tipos y concentración de los crioprotectores, el tiempo de equilibrio, la tasa de congelamiento, la tasa de descongelamiento y la evaluación de la viabilidad. Para conseguir que los espermatozoides mantengan la fertilidad, un protocolo de criopreservación óptimo debe controlar cada etapa del proceso (Suarez, 2014) (Figura 5).

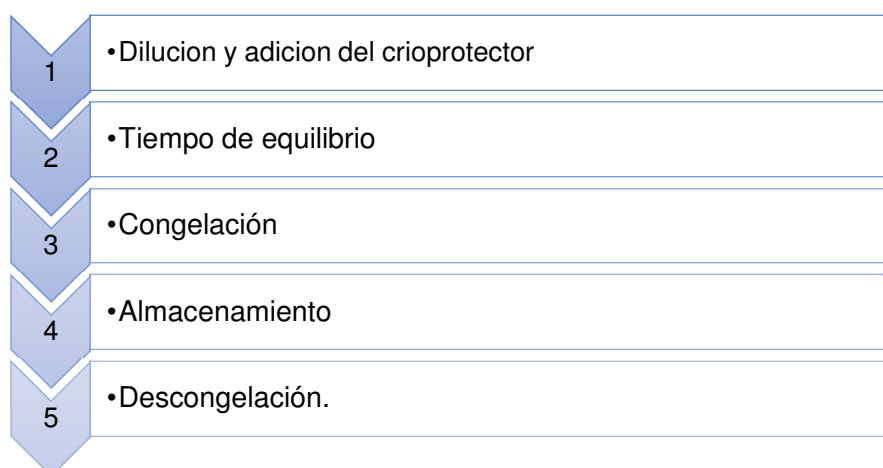


Figura 5. Etapas de un protocolo de criopreservación de espermatozoides (modificado de Suarez 2014).

2.3.1.1. Lesiones Celulares Crio Inducidas

El proceso de congelamiento y descongelamiento altera las propiedades químicas, térmicas y eléctricas de las membranas celulares debido a la formación de cristales y el choque osmótico (Ávila-Portillo et al., 2006). Actualmente, se considera que un congelamiento rápido causa daños en las células debido a la formación de cristales de hielo intracelulares, mientras que un congelamiento lento genera un desequilibrio osmótico debido al mayor tiempo de exposición a soluciones hiperosmóticas e interacciones con el hielo extracelular (Jang et al., 2017).

Durante la criopreservación las células sufren varios tipos de estrés, desde el estrés osmótico producido por las variaciones de concentraciones; el estrés mecánico, por la formación de núcleos de cristales; estrés térmico, por la rigidez de la membrana ocasionada por el descenso de la temperatura; y el estrés oxidativo, por la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO's) y la disminución de antioxidantes que se producen durante el congelamiento-descongelamiento (Suarez, 2014).

Las investigaciones con respecto al criodaño en espermatozoides revelan desequilibrios a nivel estructural y fisiológico, afectando la motilidad y en consecuencia la capacidad fecundante (Zhang et al., 2003; Espinoza et al., 2010); A nivel de ADN no existen muchas

investigaciones, no obstante, se ha reportado un incremento significativo de ADN fragmentado en espermatozoides descongelados (Cabrita et al., 2008; Zilli et al., 2003). Afortunadamente, los porcentajes de sobrevivencia celular posteriores a un proceso de criopreservación se han incrementado con el uso de soluciones crioprotectores y técnicas de congelamiento graduales (Jang et al., 2017). Las soluciones crioprotectoras son medios conformadas por una solución de extensión o dilutora y agentes crioprotectores (ACP), durante su formulación cada uno de los componentes deben ser determinados empíricamente para cada protocolo (Hubálek, 2003).

Dentro de los factores más relevantes para la formulación de soluciones crioprotectoras destacan la composición y estructura de la membrana de las células a criopreservar (Ávila-Portillo et al., 2006), esta dualidad determina el comportamiento durante el congelamiento, cuando el medio externo se torna sólido induciendo a la deshidratación celular y la lisis por la formación de núcleos de cristales. El proceso de descongelamiento es otro paso crítico durante la criopreservación, ya que una descongelamiento súbito o muy lento resulta en células inviables, por ello debe haber un equilibrio en la tasa de congelamiento y descongelamiento que permita a la célula recuperar su estructura y funcionalidad (Robles et al., 2005).

2.3.1.2. Soluciones de Extensión

Las soluciones de extensión, dilutoras o conocidas también como medios de extensión, son soluciones búfer con una osmolaridad determinada que permite disminuir la concentración de células para facilitar su conteo, mientras las mantiene viables por cortos periodos de tiempo. Por si solas, estas soluciones son empleadas en protocolos de criopreservación y almacenaje en frío durante horas, días e incluso semanas (Nimrat et al., 2006; Morales-Ueno et al., 2013).

Debido a condiciones fisiológicas, la presión osmótica celular fluctúa en un rango

determinado, por ello, una de las principales propiedades a considerar cuando se elaboran soluciones de extensión es la presión osmótica que el medio ejerce sobre las estructuras biológicas, para ello es necesario formular dilutores específicos para cada especie con una determinada osmolaridad. La osmolaridad se entiende como la cantidad de sustancia que contiene 1 mol de partículas, la unidad más representativa empleada para medir fenómenos biológicos es el miliosmol (mOsmol). El cálculo de la Osmolaridad se realiza multiplicando la molaridad por el número de partículas, por lo que, es necesario conocer si el soluto ioniza o no lo hace, ya que la ionización aumenta el número de partículas en solución (García, 2002).

De acuerdo con Morales-Ueno et al. (2013), la osmolaridad empleada para soluciones de extensión de esperma de *Litopenaeus vannamei* es de aproximadamente 800 mOsmKg⁻¹, sin embargo, Salazar et al. (2008). indican que la osmolaridad de las soluciones evaluadas en protocolos de criopreservación para la misma especie debe ser cercana a la osmolaridad del agua de mar (1,048 mOsmKg⁻¹).

Para evaluar la viabilidad espermática mediante técnicas de tinción se debe realizar el conteo de un determinado número de espermatozoides, sin embargo, el semen almacenado en los espermatóforos de *Litopenaeus vannamei* presenta una concentración bastante elevada de espermatozoides y una consistencia viscosa, estas características hacen que el conteo celular directo sea muy difícil de realizar, en consecuencia, las evaluaciones de viabilidad se realizan empleando soluciones de extensión.

Las soluciones de extensión son usadas como medios iniciales para la creación de soluciones crioprotectoras. En la naturaleza, las soluciones de extensión son aquellos líquidos donde se dispersa la esperma en el ambiente, en el caso de *Litopenaeus vannamei*, este sería el agua de mar (referenciado generalmente como SW, del inglés

“sea water”), sin embargo, en la elaboración de protocolos es preferible emplear soluciones determinadas y preparadas en laboratorio. Dentro de las principales soluciones de extensión empleados en la criopreservación de esperma de langostinos destacan el aceite mineral, solución de Hank libre de calcio, la solución salina libre de calcio (SS Ca-free), el agua de mar estéril (SSW, del inglés “sterile sea water”), la solución de Ringer (SR) y la solución buffer fosfato (SBF) (ver tabla N° 2).

2.3.1.3. Agentes Crioprotectores (ACP)

Los agentes crioprotectores son moléculas que al interaccionar con las células las protegen del criodañó, estas deben ser hidrosolubles y de baja toxicidad. Los ACP actúan favoreciendo el descenso del punto eutéctico en una solución, esto implica que se alcanzará una concentración determinada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada, disminuyendo de esta manera el gradiente osmótico (Ávila-Portillo et al., 2006).

Los ACP existen en gran variedad, pero solo algunos son usados universalmente, por ejemplo: dimetilsulfóxido, glicerol, leche descremada, albúmina, peptona, extracto de levadura, sacarosa, glucosa, metanol, y sorbitol (Hubálek, 2003). De acuerdo a su permeabilidad a la membrana celular, los crioprotectores son diferenciados en dos grupos: los crioprotectores permeables a la membrana o intracelulares y los crioprotectores no permeables o extracelulares (Jang et al., 2017).

Los crioprotectores permeables son generalmente de bajo peso molecular y actúan en la protección frente a la formación de cristales de hielo desde el interior de la célula, su uso está bastante extendido en la criopreservación destacando: el glicerol, el metanol, el etilenglicol, el 1,2-propanodiol, el dimetilsulfóxido y el $MgCl_2$; Los crioprotectores no permeables, por otra parte, agrupan a aquellas sustancias de alto peso molecular con la capacidad para deshidratar las células y proteger las membranas celulares, dentro de

este grupo destacan: la sacarosa, la trehalosa, el suero fetal bovino (SFB), el ficoll, la yema de huevo y la albúmina sérica bovina (Lichtenstein, 2009). No obstante, otros autores refieren al ficoll, los sueros, extracto de *Aloe vera* y la yema de huevo como soluciones complejas o aditivos, debido a estar compuestas por diversas sustancias (carbohidratos, lípidos, aminoácidos, proteínas, etc.) indeterminadas (Labbé et al., 2013).

De acuerdo a la clasificación bioquímica es posible distinguir tres tipos de crioprotectores: los alcoholes (metanol, etanol, propanol, 1-2 propanediol y glicerol), azúcares (glucosa, lactosa, sacarosa) y el dimetilsulfóxido (Hubálek, 2003). La diferente funcionalidad de los crioprotectores permeables y no permeables, que protegen de manera complementaria a las células, hacen necesaria la combinación de ambos en la formulación de las soluciones crioprotectoras (Ávila-Portillo et al., 2006).

Recientemente, ha tomado importancia el estrés oxidativo que sufren los espermatozoides durante la criopreservación, debido a ello, las soluciones crioprotectoras son complementadas con aditivos antioxidantes que protegen los espermatozoides mediante la inhibición de la peroxidación lipídica y reducen el estrés térmico y osmótico (Li et al., 2010; Khalili et al., 2010; Evangelista, 2015). Dentro de las principales moléculas antioxidantes, el ácido L-ascórbico (vitamina C) ha sido descrito como un factor que aumenta la calidad espermática en *Litopenaeus vannamei* (Alfaro-Montoya, 2010). Actualmente, esta vitamina se emplea en la formulación de soluciones crioprotectoras de espermatozoides en acuicultura (Liu et al., 2014).

2.3.1.4. Métodos de Criopreservación

Los métodos de criopreservación se clasifican de acuerdo a la tasa de congelamiento en: congelamiento lento, congelamiento rápido y la vitrificación o técnica de ultra-congelamiento. De acuerdo con el trabajo de Lezcano (2001), se considera como técnica de congelamiento lento cuando la tasa de congelamiento es inferior a $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y técnica

de congelamiento rápido cuando la tasa de congelamiento es igual o superior ha dicho umbral. Por otra parte, el método de vitrificación consiste en la solidificación instantánea de la muestra evitando la formación de cristales de hielo mediante elevadas velocidades de enfriamiento (García et al., 2011), esto se da debido a un congelamiento inmediato cuando las muestras son colocadas directamente en nitrógeno líquido (-196°C).

El congelamiento lento permite el ingreso de los crioprotectores y la deshidratación celular evitando así la formación de cristales internamente, sin embargo, no evita la formación de hielo extracelular y necesita de equipos especializados de alto costo. La vitrificación, en contraste, presenta ventajas en cuanto a ahorro de tiempo y la nula necesidad de equipos especializados de congelamiento, sin embargo, dentro de sus requerimientos se encuentran el empleo de mayores concentraciones de crioprotectores y tiempos de exposición (Castelo-Branco et al., 2015; Jang et al., 2017).

2.3.1.5. Remoción de Crioprotectores

Cuando el material biológico es descongelado, este se encuentra deshidratado por lo que se deben remover los crioprotectores permeables para conseguir que las células recuperen su volumen, para ello se realizan enjuagues en soluciones hiposmóticas manteniendo el equilibrio mediante el ingreso de agua a las células (Pegg, 2007). La rehidratación juega un rol importante ya que determina la correcta visualización de las células espermáticas, diversos autores recomiendan el uso de soluciones azucaradas durante este proceso (Tsai et al., 2017).

2.4. CALIDAD REPRODUCTIVA EN MACHOS DE *Litopenaeus vannamei*

De acuerdo con la metodología seguida por Pérez (2005), los criterios para evaluar la calidad reproductiva en langostinos machos son: el análisis del peso del espermatóforo y la calidad espermática en donde se incluye el porcentaje de espermatozoides viables. La calidad espermática es un indicador de la capacidad reproductiva en langostinos machos.

2.4.1. Viabilidad e Integridad de Membrana Plasmática

La calidad espermática de los langostinos no puede ser evaluada mediante los habituales índices de motilidad debido a que los espermatozoides de los crustáceos son inmóviles (Alfaro-Montoya, 2010), por consiguiente, la viabilidad espermática es el principal indicador *in vitro* de la calidad espermática y la capacidad fecundante.

Aunque hasta hace poco se aceptaba que la inducción de la reacción acrosómica era el criterio definitivo para la determinación de la viabilidad espermática en *Litopenaeus vannamei* (Cabrita et al., 2008), investigaciones recientes han demostrado que la capacitación final del espermatozoide sucede en el telico de la hembra (Alfaro-Montoya, 2010; Aungsuchawan et al., 2011; Alfaro-Montoya et al., 2016). Por esta razón, la evaluación de la reacción acrosómica mediante la técnica de agua de desove (en inglés “egg water”) para los espermatozoides extraídos de los espermatóforos de machos de *Litopenaeus vannamei* dieron como resultados bajos valores de reactividad (Wang et al., 1995; Alfaro et al., 2007; Alfaro et al., 2003), las recientes investigaciones explican también los resultados obtenidos por Lezcano (2001) en donde se evaluaron concentraciones de 8, 24, 40 y 56 µl/ml del ionóforo A23187 para activar la reacción acrosómica en la misma especie, no encontrándose células con indicios de reacción acrosómica. Aungsuchawan et al. (2011) señalaron que el sitio de fosforilación cambia desde la espina a la región del subacrosoma en los espermatozoides de *L. vannamei* cuando estos se ubican en el gonoporo del macho y sobre el telico de la hembra, respectivamente. Asimismo, Braga et al., (2014) sostienen que los espermatozoides de *Farfantepenaeus paulensis* muestran disminución en la densidad de la cromatina después de ser almacenados sobre el telico, previo a la fertilización. En consecuencia, no se puede inducir la reacción acrosómica en *Litopenaeus vannamei* debido a la falta de conocimiento sobre el mecanismo de maduración de los espermatozoides sobre el telico de la hembra, por lo tanto, no es factible considerar la reacción acrosómica como indicador de la

viabilidad espermática.

La viabilidad espermática depende principalmente de la correcta estructura del espermatozoide y de la integridad de la membrana plasmática, esta propiedad puede ser evaluada en base a técnicas de tinciones vitales como el verde rápido/eosina, la eosina/azul de anilina, el azul-tripán/giemsa o el amarillo de naftol/eritrocina, estos colorantes permiten distinguir entre las células viables e inviables.

Las principales técnicas para la evaluación de la viabilidad espermática reportadas para el género *Litopenaeus* son la tinción vital eosina-nigrosina y el Kit LIVE/DEAD (Nimrat et al., 2006; Salazar et al., 2008; Castelo-Branco, 2010; Alfaro-Montoya, 2010; Bambozzi et al., 2013; Yang et al., 2013; Uberti et al., 2014; Castelo-Branco et al., 2015; Chao et al., 2009; Morales-Ueno et al., 2013).

La técnica de tinción vital eosina-nigrosina evalúa la viabilidad en base a la absorción del colorante eosina a través de la membrana dañada del espermatozoide, los espermatozoides viables no captan la eosina, mientras que en los espermatozoides no viables hay una captación parcial o completa del colorante, en consecuencia, las células no viables se observan de una coloración rosácea mientras que las células viables se observan transparentes, el empleo de nigrosina proporciona un fondo de contraste que favorece la diferenciación entre los espermatozoides viables y no viables (Vuthiphandchai et al., 2009). Por otra parte, con el Kit LIVE/DEAD® los espermatozoides viables se tiñen de verde fluorescente, mientras que los espermatozoides no viables se tiñen de un rojo fluorescente (Morales-Ueno et al., 2013).

La evaluación de la viabilidad espermática se puede realizar empleando la microscopia óptica de contraste diferencial, la microscopia óptica de contraste de fase y la citometría de flujo (Lezcano et al., 2004). Las comparaciones entre las evaluaciones mediante la citometría de flujo y la tinción eosina-nigrosina concluyeron que la citometría de flujo mantiene una correlación positiva con respecto a los resultados obtenidos con la

microscopia óptica, sin embargo, algunos estudios reportan que la evaluación con la citometría resulta en porcentajes de viabilidad inferiores con respecto a la técnica de tinción (Lezcano et al., 2004), mientras que otros autores reportan lo contrario (Salazar *et al.*, 2008; Uberti et al., 2014). Finalmente, los trabajos empleando ambas técnicas reportan que la aplicación de cualquiera las dos técnicas generan resultados confiables, por lo que, debido al bajo costo de la técnica eosina-nigrosina, esta resulta ser más económica (Uberti et al., 2014).

3. ANTECEDENTES

La implementación de la criopreservación en los cultivos acuícolas permite preservar recursos genéticos y desarrollar programas de selección genética avanzados, no obstante, uno de los principales problemas de la aplicación generalizada de esta técnica radica en la alta especificidad de los protocolos de criopreservación para cada población, ya que incluso se han reportado diferencias entre protocolos desarrollados para la misma especie en estado silvestre y en cultivo (Vuthiphandchai et al., 2007; Chomphuthawach, 2015), de lo mencionado anteriormente, se desprende la necesidad de desarrollar protocolos específicos para cada población.

Actualmente, los protocolos de criopreservación se aplican sobre diversas estructuras reproductivas y estadios tempranos de desarrollo como los embriones y larvas. En la revisión de Martínez-Páramo et al. (2017) se sintetizan elocuentemente los protocolos de criopreservación desarrollados para peces de aguas dulce y marina: salmónidos, ciprínidos y esturiones; especies relacionadas a la acuariofilia; y dentro del grupo de los invertebrados: ostras, equinodermos, tunicados, mitílidos y langostinos.

Los trabajos relacionados con el desarrollo de protocolos de criopreservación de gametos de decápodos iniciaron en la década de los ochenta (Chow et al., 1985; Diwan & Joseph, 1999; Goldberg et al., 2000), siendo los principales géneros estudiados *Macrobrachium*,

Sicyona y *Penaeus*, sobre estos se evaluaron la toxicidad de diversos crioprotectores (Dong et al., 2004; Memon et al., 2012; Lezcano et al., 2004; Uberti et al., 2014; Valentina et al., 2016).

Se realizaron investigaciones para determinar las soluciones de extensión más adecuados para el almacenamiento en frío del espermatóforo de *Litopenaeus vannamei*, entre los que se evaluaron el aceite mineral, la solución Ringer, el búfer fosfato, la solución salina balanceada de Hank, la solución salina balanceada de Hank libre de calcio, solución salina libre de calcio modificada y una solución de NaCl 0.85% (Nimrat et al., 2006; Morales-Ueno et al., 2013). Durante el almacenamiento en frío estas soluciones fueron suplementadas con antibióticos y antimicóticos debido a que las muestras no fueron congeladas y son susceptibles a contaminación fúngica y bacteriana. Estas investigaciones no son consideradas como criopreservación en el sentido estricto de la palabra, pero evalúan las soluciones de extensión permitiendo sentar las bases para el desarrollo de un protocolo. Los mejores resultados se describen en la (Tabla 1).

Tabla 1. Investigaciones en almacenamiento en frío de espermatozoides de *Litopenaeus vannamei*.

Referencia	Especie	Solución de extensión	Temperatura y tiempo de almacenamiento	Técnica de Evaluación de la Viabilidad	Viabilidad espermática (%)
Morales et al. (2013)	<i>Litopenaeus vannamei</i>	SS Ca-free + 20 µL de penicilina, estreptomicina y anfotericina.	Mantenido a 23 °C y evaluado cada 3 horas hasta las 12 horas.	Kit de viabilidad espermática LIVE/DEAD	92%
Nimrat et al. (2006)	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aceite mineral + 0.1 % penicilina y estreptomicina	Mantenido de 2 a 4 °C evaluado a los 35 días.	Tinción eosina 0.5% - nigrosina 10%	55.7%

Diversos protocolos de criopreservación han sido ensayados en langostinos peneidos evaluando las soluciones de extensión, crioprotectores, tiempos de exposición, método de congelamiento, técnica de descongelamiento, tiempo de almacenamiento y técnica de evaluación (Tabla 2). La calidad de los espermatóforos se ha evaluado mediante: peso,

conteo espermático, porcentaje de espermatozoides vivos, y porcentaje de espermatozoides anormales.

Los resultados mostraron que los espermatozoides criopreservados en nitrógeno líquido mantienen la viabilidad por periodos cortos, pero que decae en el tiempo. Vuthiphandchai et al. (2007) describieron para *Penaeus monodon*, tasas de fertilización y de cosecha de larvas, alcanzando hasta un promedio de 72%, con esperma congelado por 60 días. Lezcano et al. (2004) reportaron una viabilidad baja de 38.60% a los 60 días de criopreservar la masa espermática de *Litopenaeus vannamei*. No obstante, el trabajo de Castelo-Branco et al. (2015) reportaron hasta un 91% de viabilidad en células espermáticas de *Litopenaeus vannamei* congeladas durante 180 días aplicando el método de vitrificación.

Para los langostinos peneidos se han formulado diversos protocolos de criopreservación, empleando exitosamente variados crioprotectores internos como el metanol (MeOH) (Lezcano et al., 2004; Castelo-Branco et al., 2015), dicloruro de Magnesio (MgCl₂) (Memon et al., 2012) y dimetilsulfóxido (DMSO) (Yang et al., 2013; Uberti et al., 2014; Chao et al., 2009). Los parámetros dentro de los protocolos reportados con mejores porcentajes de viabilidad varían en los tiempos de exposición a los crioprotectores permeables, pero permanecen dentro de un rango entre 10 a 30 minutos; el método de enjuague empleado en la mayoría de protocolos consistió en lavados con solución salina libre de calcio o soluciones enriquecidas con sacarosa. Por último, las temperaturas de descongelamiento reportados varían entre 20°C hasta 37°C.

En el Perú se han desarrollado investigaciones en criopreservación de gametos de *Vicugna pacos* ("alpaca") (Mancisidor, 2013; Suarez, 2004), *Engraulis ringens* ("anchoveta") (Cactoparco et al., 2010) y *Paralichthys adspersus* ("lenguado") (Montes, 2012), no se han encontrado reportes de investigación referente a la criopreservación de gametos o larvas de *Litopenaeus vannamei* o referente a algún crustáceo.

Tabla 2. Investigaciones en Criopreservación de Gametos Masculinos en Langostinos Peneidos.

Referencia	Especie / Método	Estructura Reproductiva	Solución crioprotectora	Protocolo de congelamiento/ descongelamiento	Enjuague y tiempo de evaluación.	Técnica de Evaluación	Viabilidad espermática (%)
Castelo- Branco et al. (2015)	<i>Litopenaeus vannamei</i> Vitrificación	ME	MeOH 30%, lecitina de soya 2%, Trehalosa 0.4 M en SS Ca-free. Tiempo de exposición de 10 min a 25 °C. (Vol. final 0.5 ml)	Vitrificación: inmersión directa en NL. / Baño María a 20°C durante 10 s.	Enjuague doble en SS Ca-free. Evaluación después de 1, 30, 60 y 120 días.	Tinción eosina-nigrosina/ Microscopia de fluorescencia y Hemocitómetro.	91.3±2.3% después de 120 días.
Uberti et al. (2014)	<i>Litopenaeus vannamei</i> Congelamiento rápido	SE	DMSO o EG 10%, Yema de huevo 5%, sacarosa 0.2 M en SSW. Tiempo de exposición de 10 min. (Vol. final 0.5 ml).	Exposición a vapores de NL (5 min) e inmersión en NL. / Baño María a 20-25°C durante 40 s, resuspensión en sacarosa 0.2 M en SSW.	Homogeneizado y resuspensión en sacarosa 0.2 M en SSW. Evaluación después de 0, 30, 60 y 90 días.	Análisis por citometría de flujo/ Tinción eosina-nigrosina.	55% para DMSO y EG después de 30 días.
Yang et al. (2013)	<i>Litopenaeus vannamei</i> Congelamiento lento.	SE	DMSO 10%, trehalosa 0.25 M en SSW. Tiempo de exposición de 30 min a 4 °C. (Vol. final 0.5 ml).	De 4 a -20 °C a una tasa de -5°C/min, suspensión de 5 min. -20 a -80 °C a una tasa de -10°C/min, suspensión de 5 min e inmersión en NL. / Baño María a 37°C.	No menciona. Evaluación después de 0, 30, 150 y 270 días.	Tinción eosina-nigrosina.	65.0% después de 30 días.
Chao et al. 2009	<i>Litopenaeus vannamei</i> Congelamiento lento.	E	DMSO 5% en SS Ca-free. Tiempo de exposición de 30 min a 25 °C. (Vol. final 0.5 ml).	De 25°C hasta -80 a -2 °C/min mantenido durante 2 min e inmersión en NL. / Baño María a 30°C durante 2 min y resuspensión en sacarosa 0.2 M SSW.	Enjuague doble en SS Ca-free. Se evaluaron las muestras durante 70 días, cada 10 días.	Análisis por citometría de flujo/ Tinción eosina-nigrosina.	37.0% después de 30 días.

Salazar et al. 2008	<i>Litopenaeus vannamei</i> Congelamiento lento.	E, ME y SE.	MeOH 10%, yema de huevo 10%, sacarosa 0.2M en SSW. Tiempo de exposición de 10 min a 4 °C. (Vol. final 0.5 ml).	Colocar los crioviales a – 6°C. De –6°C hasta –32°C a 0.5°C/min e inmersión en NL. /Baño María a 20°C durante 10 s y resuspensión en 1 ml sacarosa 0.2 M SSW a Temp. Ambiente.	Homogeneizado y resuspensión en sacarosa 0.2 M en SSW. Evaluación después de 72 h.	Análisis por citometría de flujo/ Tinción eosina 5% nigrosina 10%.	62% para ME después de 72 h.
Lezcano et al. 2004	<i>Litopenaeus vannamei</i> Congelamiento lento y rápido.	E, ME y SE.	MeOH 10%, yema de huevo 10%, sacarosa 0.2 M en SSW a 35 ppt. Tiempo de exposición variable para cada protocolo. (Vol. final 1 ml).	Rápido: De 23 °C a - 10°C/min e inmersión en NL. Tiempo de equilibrio de 1 hora para E y ME; 15 min para SE. / Baño María a 28°C durante 1 min y resuspensión en sacarosa 0.2 M SSW Lento: De 23 °C hasta -32 °C a -0.5°C/min, e inmersión en NL. SE y ME en pajillas y E en microtubos. /Para E: A 25°C durante 40 s. Para ME y SS: A 20°C durante 10 s. Resuspensión en sacarosa 0.2 M SSW	Centrifugado a 200 G durante 2 minutos. Evaluación después de 3 días.	Análisis por citometría de flujo/ Tinción eosina nigrosina.	E, ME y SS: 2% en todas las estructuras después de 3 días. ME: 61.6%. SE: 45% E: 25% después de 3 días.
Dumont et al. 1992 (Citado en Gwo, J. 2000)	<i>Litopenaeus vannamei</i> congelamiento rápido	E	Glicerol 15%. Tiempo de exposición de 18-25 min. Temp ambiente.	Temperatura ambiente hasta -30°C a 4.5°C/min. Almacenado a dicha temperatura. /Baño María a 25°C.	No menciona	Inseminación artificial.	43% fertilidad.

Bambozzi 2013	<i>Litopenaeus schmitti</i> congelamiento lento y rápido.	E y ME	ME: DMSO 10% y glicerol 10%. E: glicerol 10% en SS Ca-free. Tiempo de exposición de 30 min a 25 °C. (Vol. final 0.5 ml).	Lento: desde -6 hasta -32 a 0.5 °C/min e inmersión en NL. Rápido: De 5 °C hasta - 120 °C a 20 °C/min e inmersión en NL. /ME: Baño maría a 20 °C durante 10 s. E: Baño maría a 30 °C por 2 min.	No menciona. Evaluación después de 30, 60 y 90 días.	Tinción eosina 0.5% - nigrosina 10%.	ME:30% E:30%. Protocolo lento, después de 30 días.
Castelo- Branco (2010)	<i>Litopenaeus schmitti</i> congelamiento lento	ME	Glicerol 10% en SS Ca- free. Tiempo de exposición de 10 min a 25 °C (Vol. final 0.5 ml).	De 25 °C hasta -6 °C a - 0.5 °C/min. sembrar. Continuar congelando a 0.5 °C/min hasta -32 °C, e inmersión en NL. /Baño María a 20 °C por 10 segundos.	Resuspensión en 1 ml sacarosa 0.2 M SSW a Temp. ambiente. Evaluación después de 1, 15 y 30 días.	Tinción eosina 0.5% - nigrosina 10%.	42.78% después de 15 días.
Chomphuthaw ach (2015)	<i>Penaeus monodon</i> congelamiento lento y rápido.	E	DMSO 10% en SS Ca-free + antibióticos. Tiempo de exposición de 30 min a 25 °C. (Vol. final 0.5 ml).	De 25 °C hasta -30 °C o - 80 °C a -2,-4,-6 u -8 °C/min, e inmersión en NL. /Baño María a 30 °C durante 1.5 min.	Enjuague doble en SS Ca-free a Temp. ambiente. Evaluación después de 0,30,60 min 1,3,5,7 d.	Tinción eosina 5% - nigrosina 10%.	62.73±16.19% a una T final de -80 °C a -6 °C/min, después de 3 días.
Vuthiphandch ai et al. (2007)	<i>Penaeus monodon</i> congelamiento lento	E	DMSO 5% en SS Ca-free. Tiempo de exposición de 10 min a 25 °C. (Vol. final 0.5 ml).	De 25 °C hasta -80 °C a -2,- 4,-6,-8,-10,-12,-14,-16 °C/min e inmersión en NL. /Baño maría a 30 °C, 50 °C, 70 °C o 90 °C por 2 min.	Enjuague doble en SS Ca-free a Temp. ambiente. Evaluación después de 0, 30, 60, 90, 210 días.	Tinción eosina 0.5% - nigrosina 10%.	87.3 ±4.1%. Después de 90 días, empleando una tasa de - 2 °C/min y una temp de descongelamiento de 30 °C.

Bart et al. (2006)	<i>Penaeus monodon</i> congelamiento lento	E	DMSO 5% en SS Ca-free. Tiempo de exposición de 30 min a 25 °C. (Vol. final 0.5 ml)	De 25°C hasta -10 °C a - 15°C/min, de -10°C hasta - 80°C a -2°C/min e inmersión en NL. /Baño maría a 30°C por 2 min.	No menciona. Evaluación después de 2 días.	Tinción eosina 5% - nigrosina 10%.	79.7 ±0.4% después de 2 días.
Memon et al. (2012)	<i>Penaeus merguensis</i> congelamiento lento	E	MgCl ₂ 15% en SS Ca-free. Tiempo de exposición de 15 min a 25 °C. (Vol. final 0.5 ml).	De 25, 20, 16, 4, 2, -4, -20, -80, - 150°C/10 min e inmersión en NL. /Baño María a 25°C, 27°, 29°C y 31°C durante 2 min.	Homogeneizado y resuspensión en SS Ca-free. Evaluación después de 6, 12, 24 h; 7, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días	Tinción eosina- nigrosina.	61±12% después de 60 días y T desc. de 27°C.
Diwan & Joseph (2000)	<i>Penaeus indicus</i> Congelamiento lento.	E	DMSO 5%, Glicerol 5% en SSW (30ppt) o DMSO 5%, trehalosa (0.25 M) en SSW (30 ppt). Tiempo de exposición de 5 min a 25 °C. (Vol. final 0.5 ml).	De 25°C hasta -35°C a - 1°C/min, vapores de nitrógeno por 5 min e inmersión en NL. /Baño María a 20°C.	Homogeneizado y resuspensión en 100 ul de agua de huevo durante 1h. Evaluaciones después de 7, 15, 30 y 60 días.	Reacción acrosómica	67-70% después de 60 días.
Ke & Cai (1996)	<i>Penaeus chinensis</i> congelamiento lento	E	DMSO 10%, Glicerol 7.5% en SSW (30ppt). (Vol. final 0.5 ml).	Descongelamiento en Baño maría a 35°C.	Evaluaciones después de 94-138 días.	Viabilidad/Insemin ación artificial.	72.0±13.6% viabilidad.

Leyenda: Agua de mar estéril (SSW); Solución salina libre de Calcio (SS Ca-free); dimetilsulfóxido (DMSO); masa espermática (ME); espermatóforo (E); suspensión espermática (SE); nitrógeno líquido (NL); etilenglicol (EG).

4. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

4.1. HIPOTESIS

4.1.1. Hipótesis Alternativa

H1: El método de vitrificación mantiene la viabilidad espermática más elevada en el espermátóforo que en la masa espermática de *Litopenaeus vannamei* empleando soluciones enriquecidas con antioxidantes, crioprotectores permeables, crioprotectores no permeables y soluciones complejas.

4.1.2. Hipótesis Nula

H0: El método de vitrificación mantiene la viabilidad espermática más elevada en la masa espermática que en el espermátóforo de *Litopenaeus vannamei* empleando soluciones enriquecidas con antioxidantes, crioprotectores permeables, crioprotectores no permeables y soluciones complejas.

Entre las variables a tener en cuenta en este estudio están:

Variable Dependiente: La viabilidad espermática de *Litopenaeus vannamei*.

Variables Independientes: Estructuras reproductivas, soluciones de extensión, crioprotectores permeables, concentración de los crioprotectores, tiempo de exposición, crioprotectores no permeables y soluciones complejas.

4.2. OBJETIVOS

4.2.1. Objetivo General

Formular y evaluar protocolos de criopreservación óptimos para el espermátóforo (E) y la masa espermática (ME) empleando el método de vitrificación que mantengan la viabilidad espermática en *Litopenaeus vannamei*.

4.2.2. Objetivos Específicos

- Determinar la solución de extensión más apropiada para la criopreservación del espermátforo y la masa espermática de *Litopenaeus vannamei*.
- Determinar el crioprotector permeable, la concentración y el tiempo de exposición menos tóxico para el espermátforo y la masa espermática de *Litopenaeus vannamei*.
- Determinar la solución crioprotectora óptima para la viabilidad espermática del espermátforo y la masa espermática de *Litopenaeus vannamei* post congelamiento.
- Evaluar las diferencias en la viabilidad espermática en base a las estructuras reproductivas (E y ME) en espermatozoides de *Litopenaeus vannamei*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. Material Biológico

Se emplearon individuos sexualmente maduros libres de patógenos (SFP) de la especie *Litopenaeus vannamei* (n=600) con un peso corporal promedio (W g) de 28 ± 4.67 gramos. Los ejemplares fueron acondicionados y mantenidos en el área de Líneas Puras del Centro de Investigación y Desarrollo de Post-larvas de Langostino *Litopenaeus vannamei* de la empresa langostinera MarinaSol S.A.C Tumbes-Perú. (Figura 6).



Figura 6. Área de Líneas Puras del Centro de Investigación y Desarrollo de Post-larvas de Langostino *Litopenaeus vannamei* de la empresa langostinera MarinaSol S.A.C

5.1.2. Material de Laboratorio

Conformado por materiales empleados en la extracción de los espermatóforos y la masa espermática, la preparación de soluciones crioprotectores, ejecución de los protocolos de congelamiento, la determinación de la viabilidad espermática y la inseminación artificial, estos incluyen: algodón, papel toalla, guantes quirúrgicos, mascarillas, bandejas plásticas, tubos de centrifuga de 50 mL y 15 mL, láminas portaobjetos, láminas cubreobjetos, microtubos de 1,5 mL, crioviales de 1,5 mL, micropipetas de 1 a 1000 μ L, micropipetas de 0,5-10 μ L, tips de 500-1000 μ L, tips de 0,5-10 μ L, pinzas estériles, papel filtro (Whatman 40), pipetas de 1 ml, termómetros, frascos de vidrio de 1L resistente a la presión.

5.1.3. Equipos e Instrumentos

5.1.3.1. Mantenimiento de Reproductores

Los langostinos reproductores empleados fueron mantenidos en 8 estanques circulares, con flujo de agua constante, equipados con un sistema de aireación continuo alimentado por dos aireadores de 2 HP de potencia.

El agua para el cultivo fue obtenida mediante la filtración mecánica del agua marina a través de sistema de pozo, el agua fue procesada para regular la salinidad y la temperatura mediante equipos de osmosis inversa y calderas.

Para la manipulación durante la fase experimental de evaluación e inseminación artificial de los langostinos se emplearon: cámaras oscuras, calefactores, piedras difusoras, tanques de desove, mangueras, redes, alimento balanceado modificado.

5.1.3.2. Viabilidad Espermática y Criopreservación

Balanza de alta sensibilidad (OHAUS), contadores analógicos, cámara de flujo laminar, autoclave, microscopio con luz incorporada de 1000X, tanque de nitrógeno líquido, refrigeradora, láminas portaobjetos, laminillas cubreobjeto.

5.1.3.3. Soluciones y Reactivos

Alcohol 96 °C, ácido bórico (H_3BO_3), hidróxido de sodio (NaOH), sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), dicloruro de calcio ($CaCl_2$), difosfato de sodio (NaH_2PO_4), difosfato de potasio (KH_2PO_4), agua de mar estéril (SSW), nitrógeno líquido (NL), metanol (MeOH), dicloruro de magnesio ($MgCl_2$), 2-isopropanol, dimetilsulfóxido (DMSO), leche descremada (LD), polietilenglicol (PEG), sacarosa, ácido L-ascórbico, manitol, extracto crudo de *Aloe vera*, yema de huevo, suero fetal bovino (SFB), Suero de ternero ("Calf serum"), colorantes eosina y nigrosina.

5.2. METODOLOGÍA

5.2.1. Manejo de Reproductores

Los ejemplares reproductores fueron provistos por el "Centro de Investigación y Desarrollo de Post-larvas de Langostino *Litopenaeus vannamei* -MarinaSol S.A.", ubicado en el departamento de Tumbes, provincia de contralmirante Villar, distrito de Canoas de Punta Sal, caleta de Punta Mero (Latitud Sur 03°54'26" S y 80° 52'43" O) (Figura 7).

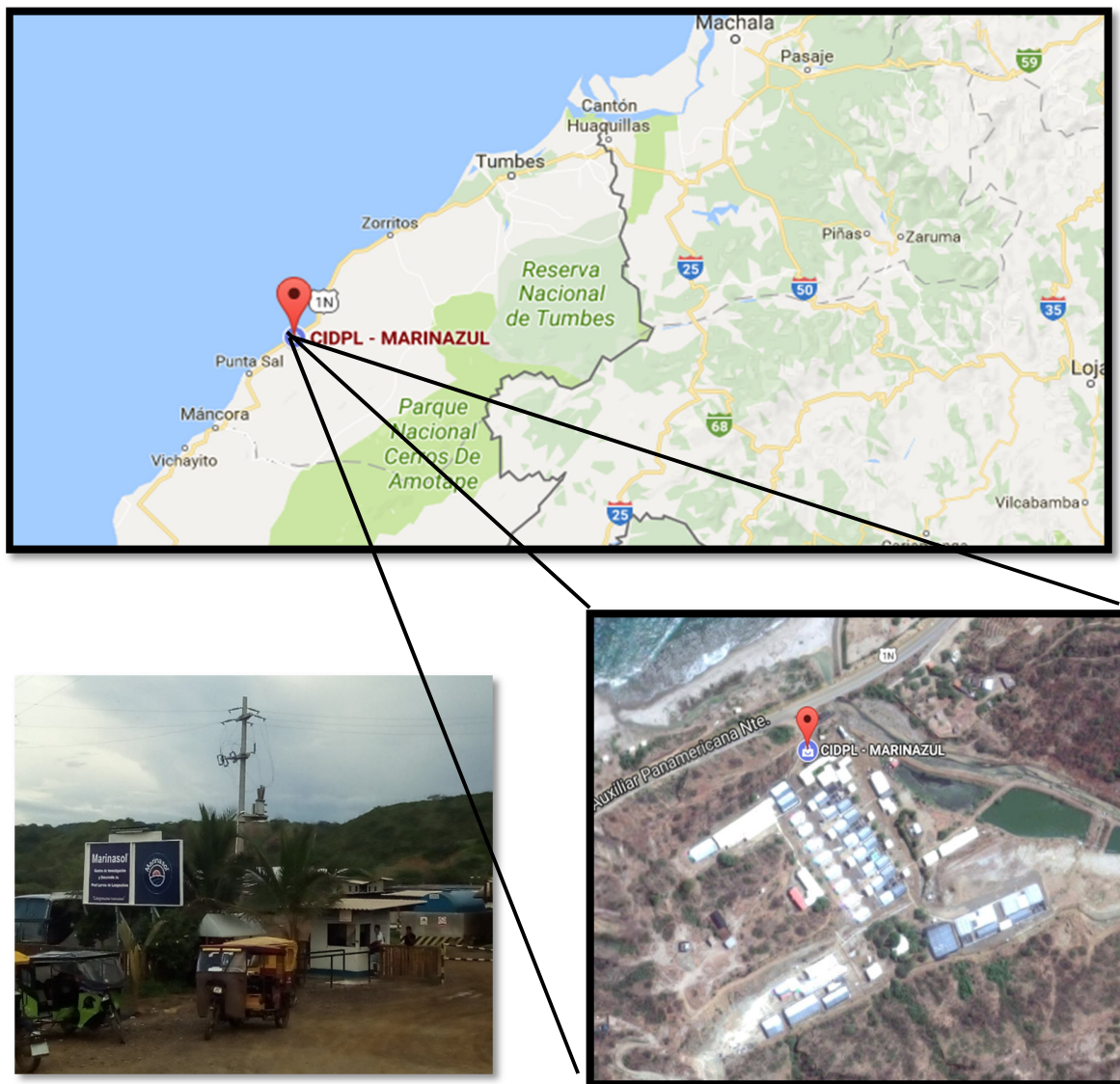


Figura 7. Ubicación geográfica del “Centro de Investigación y Desarrollo de Post-larvas de Langostino *Litopenaeus vannamei* - MarinaSol S.A.C., situado en el departamento de Tumbes, provincia de contralmirante Villar, distrito de Canoas de Punta Sal, caleta de Punta Mero.

Los langostinos fueron mantenidos en estanques circulares de 20 m² (5 langostinos/ m²) con agua de mar a una salinidad promedio de 30 ppm y con un fotoperiodo natural de 12 horas luz: 12 horas oscuridad en sistemas tipo invernadero. Los langostinos fueron alimentados cuatro veces al día (a las 09:00 am, 02:00 pm, 08:00 pm y 02:00 am) con dieta de maduración comercial (5% de la biomasa) y alimento fresco compuesto de mitílidos, poliquetos, y calamares frescos (20% de la biomasa). La remoción de los

residuos orgánicos se realizó dos veces al día mediante la técnica de sifoneo, el recambio del volumen de agua se realizó diariamente. Los parámetros de la calidad del agua fueron monitoreados diariamente a las 09:00 am y se mantuvieron dentro de los rangos adecuados: Temperatura 28°C, pH 7.5, y Oxígeno disuelto 5 mg/L (Husien & Aguillón, 2008).

Dentro de las actividades de mantenimiento del área de reproductores se realizaron: el manejo del alimento, monitoreo biométrico, manejo de la calidad del agua y limpieza (sifoneo y recambio). Adicionalmente, la trazabilidad de los individuos se realizó mediante el anillamiento del pedúnculo ocular y el empleo de elastómero intramuscular. Durante la fase experimental solo se emplearon langostinos machos con espermatóforos no necrosado.

5.2.2. Colecta de las Estructuras Reproductivas

La colecta de estructuras inicia con la pesca de individuos machos de los tanques, estos son seleccionados de acuerdo a características externas de madurez sexual tales como el tamaño, peso y la formación completa del espermatóforo. Las evaluaciones se realizaron empleando como estructuras reproductivas a criopreservar el espermatóforo y la masa espermática independientemente.

5.2.2.1. Espermatóforo

Los especímenes machos sexualmente maduros mostraron el espermatóforo hinchado de color blanco lechoso a la altura de la base del 5to par de patas caminadoras (pereiópodos). La extracción de los espermatóforos se realizó presionando sobre la coxa del 5to par de pereiópodos, provocando la eyección del espermatóforo y retirándolo con ayuda de una pinza estéril.

La técnica empleada requiere poder manipular el langostino por la vista ventral con una sola mano, cogiendo la región cefálica con el índice hasta lograr exponer la zona ventral entre los pereiópodos y pleopodos, logrando así exponer la coxa. Otra técnica reportada por los investigadores consiste en la electroeyaculación en crustáceos, no obstante, por la facilidad de la técnica de dígito presión esta fue escogida para el presente proyecto.

5.2.2.2. Masa Espermática

La obtención de la masa espermática se realizó mediante la presión de la zona posterior del espermatóforo, conocida como ámpula, esta región se presiona entre los dedos pulgar e índice logrando la liberación de una gota semilíquida la cual contiene los espermatozoides, la masa espermática. Durante el procedimiento se debe tener cuidado de no destruir el tejido del espermatóforo ni de mezclar la masa espermática con la sustancia gelatinosa, ya que estos restos celulares dificultan la visualización de los espermatozoides en el microscopio.

Posteriormente la masa espermática fue trasladada con ayuda de una pinza estéril hacia los microtubos, crioviales o láminas portaobjeto, dependiendo del protocolo.

5.2.3. Diseño Experimental

La formulación de protocolos de criopreservación se realizaron en base a dos estructuras reproductivas, el espermatóforo y la masa espermática. Los componentes de la fórmula final de las soluciones crioprotectoras para el espermatóforo y la masa espermática se obtuvieron gradualmente mediante la evaluación de la viabilidad espermática en cada fase de la experimentación, para ello se evaluó la citotoxicidad de cada componente durante los principales pasos para la formulación de la solución crioprotectora.

Se aplicó un diseño experimental aleatorio, factorial, y tetrafásico, los cuales incluyeron: (1) determinación de la solución de extensión, (2) determinación del crioprotector

permeable (3) determinación del crioprotector no permeable y (4) determinación de la solución compleja.

Posteriormente se procedió a evaluar la viabilidad espermática post-vitrificación y la viabilidad *in vivo* cualitativamente mediante inseminación artificial (IA). El flujograma de trabajo desarrollado se muestra en la figura 8.

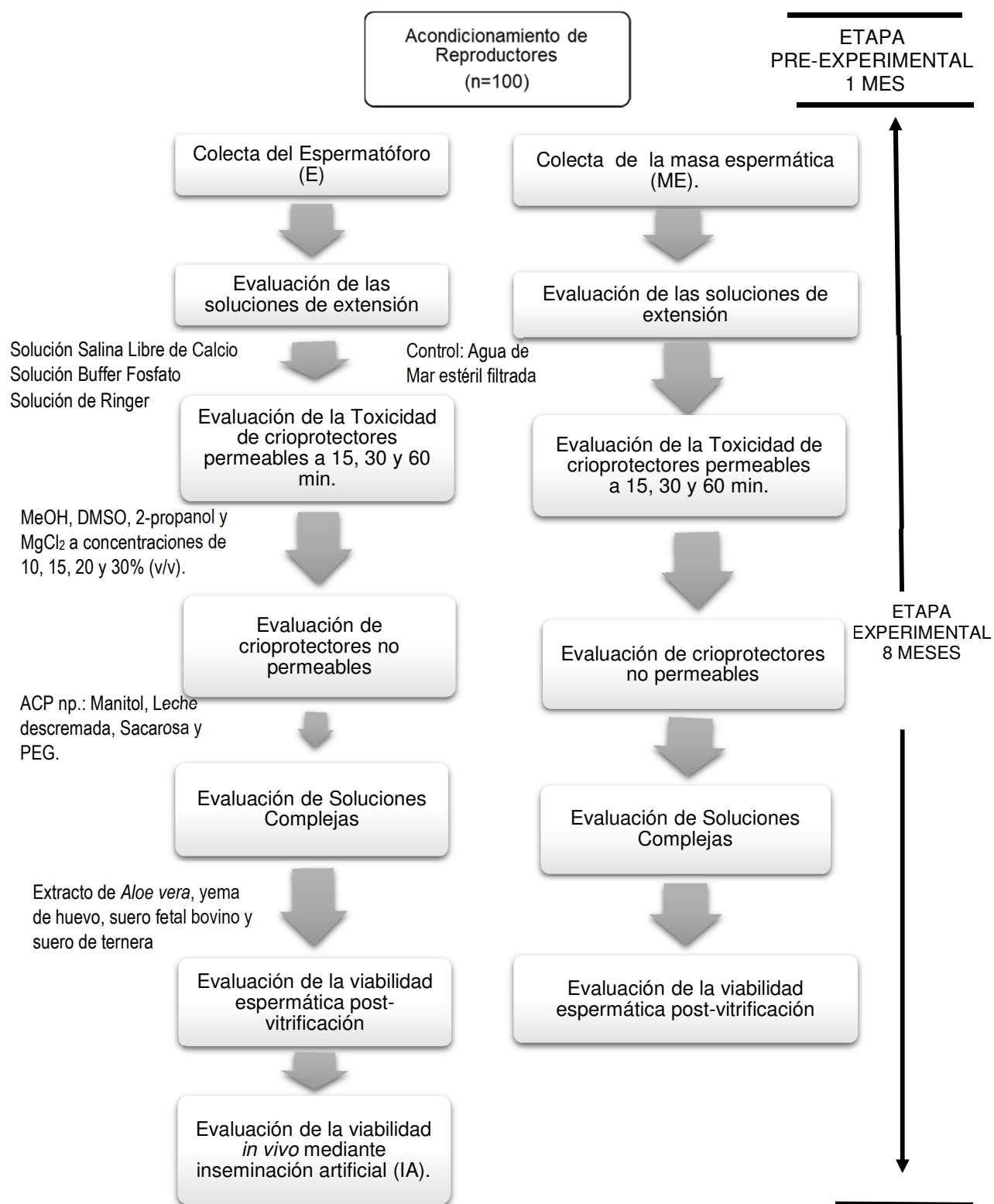


Figura 8. Flujograma de trabajo para la formulación de protocolos de criopreservación de gametos masculinos en *Litopenaeus vannamei*.

5.2.4. Procesamiento y Evaluación de la Viabilidad Espermática

5.2.4.1. Evaluación de la Viabilidad Espermática (VE) mediante Tinción vital con Eosina-Nigrosina.

La viabilidad de las células espermáticas fue determinada mediante la tinción vital con eosina-nigrosina (Jeyalektumie & Subramoniam, 1989; Salazar et al., 2008), considerando la presencia de la espina en el espermatozoide como signo de viabilidad de acuerdo a la metodología reportada por Lezcano et al. (2004).

Para evaluar la viabilidad espermática se extrajo la masa espermática del espermatóforo y se diluyó en 250 µl de SS Ca-free, luego se homogenizó la muestra y se tomó una alícuota de 10 µl la cual se colocó sobre una lámina portaobjetos, el siguiente paso fue añadir 5 µl de eosina 5% y mezclar durante 10 segundos, después se añadió 5 µl de nigrosina 10% y se mezcló sobre la lámina. Posteriormente, se procedió a extender la mezcla con ayuda de otra lámina y se dejó secar mediante aireación durante 1 minuto.

Finalmente, las láminas fueron examinadas a un aumento de 400X con ayuda de un microscopio con luz incorporada. Las células muertas se tiñeron de color rosado mientras que las células vivas se observaron incoloras y brillantes sobre un campo de fondo oscuro.

El porcentaje de viabilidad se calculó mediante el conteo de un mínimo de 250 células por lamina (Nimrat et al., 2006). La lectura de cada replica se realizó por duplicado, cuidando de mantener siempre el porcentaje promedio aceptable entre los dos conteos, caso contrario se realizó el conteo de otra lamina adicional.

Preparación de los colorantes (Figura 8):

- **Eosina 5%**

La eosina Y hidrosoluble ($C_{20}H_8Br_4O_5$, tetrabromofluoresceína) es un colorante de carácter ácido, por lo cual tiñe sustancias básicas, que a su vez son denominadas eosinófilas por su afinidad por la eosina. La eosina Y hidrosoluble (Sigma-Aldrich) viene a una concentración de 5% por defecto, sin embargo, para su utilización se tamizaron pequeños volúmenes mediante papel de filtro. La eosina filtrada fue almacenada en un tubo falcón cubierto con papel aluminio y mantenido a una temperatura de 4 °C.

- **Nigrosina 10%**

De acuerdo a las recomendaciones de la investigadora PhD. Thais Castelo-Branco Chávez [Comunicación personal], la preparación de la nigrosina al 10% se desarrolló de la siguiente manera: Se diluyó 10 gr del cristal en 100 mL de agua destilada en un tubo cónico para centrifuga (para lograr una mejor disolución se calentó la solución sumergiéndola en agua hirviendo durante 30 minutos). Después, se dejó enfriar y se añadió 0,5 ml de formalina. La solución obtenida fue tamizada mediante papel filtro y almacenada en un tubo cónico para centrifuga cubierto con papel aluminio y mantenida a una temperatura de 4 °C.

5.2.4.2. Evaluación del Peso de los Espermátóforos

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre el peso de los espermátóforos izquierdo y derecho de los langostinos evaluados durante la experimentación, se evaluaron los pesos con ayuda de una balanza de 4 dígitos de sensibilidad y se analizaron los resultados con una prueba de t-student.

5.2.5. Formulación de Protocolos de Criopreservación

5.2.5.1. Evaluación y Preparación de las Soluciones de Extensión

Para la determinación de la solución de extensión más adecuada para el espermátforo y la masa espermática se consideró el agua de mar estéril (SSW) como control y se evaluaron tres soluciones: solución de Ringer (SR), solución buffer fosfato (SBP) (Fatihah et al., 2016), y solución salina libre de calcio (SS Ca-free) (Morales-Ueno et al., 2013; Castelo-Branco et al., 2015) empleadas comúnmente en como medios de extensión en para almacenamiento en frío de espermatozoos. Las tres soluciones fueron suplementadas con ácido L-ascórbico a una concentración de 5 mM, con la finalidad de mejorar la solución con un agente antioxidante. Adicionalmente se calculó que la presión osmótica de las soluciones fuera de aproximadamente 800 mOsmoles/Kg (Morales-Ueno et al., 2013). Las soluciones empleadas en la experimentación fueron preparadas en condiciones de laboratorio y esterilizadas en autoclave durante 15 min a una temperatura de 121 °C y una presión de 15 psi.

La evaluación se realizó en microtubos de 1.5 mL conteniendo 500 µl de solución de extensión, en cada microtubo se colocó únicamente una estructura reproductiva (espermátforo o masa espermática) de individuos sexualmente maduros (n=40). Se emplearon 5 réplicas por cada tratamiento, incluyendo el grupo control. La viabilidad espermática fue determinada mediante la técnica de tinción vital con eosina-nigrosina después de transcurridas 12 horas de almacenamiento a temperatura ambiente. La evaluación del SSW se realizó inmediatamente después de la colecta de la estructura reproductiva.

➤ Preparación del agua de mar estéril (SSW)

Para la preparación del SSW se colectaron 20 litros del estanque de sedimentación del CEBAP (Puerto Pizarro, Tumbes), este volumen de agua se dejó sedimentar durante 24

horas, posteriormente se extrajo 1 litro del sobrenadante en un frasco de vidrio el cual fue transportado al laboratorio para su esterilización. El resto de soluciones fueron preparados en base a la composición publicada en artículos de investigación.

La composición de la solución salina libre de calcio (SS Ca-free) se resume en la Tabla 3:

Tabla 3. Composición de la Solución Salina libre de Calcio (SS Ca-free).

COMPONENTES	PESO (g/L)
NaCl	21,63
KCl	1,12
H3BO3	0,53
NaOH	0,19
MgSO4.7H2O	4,93

Fuente: Vuthiphandchai et al. (2007); Castelo-Branco et al. (2015).

La composición de la solución de Ringer (SR) se resume en la Tabla 4:

Tabla 4. Composición de la solución de Ringer (SR).

COMPONENTES	PESO (gr/L)
NaCl	7,2
KCl	0,37
CaCl2	0,17

Fuente: Fatihah et al. (2016).

La composición de la solución Buffer Fosfato (SBP) se resume en la Tabla 5:

Tabla 5. Composición de la Solución Buffer Fosfato (SBP).

COMPONENTES	PESO (gr/L)
NaH2PO4	2,86
KH2PO4	0,37

Fuente: Fatihah et al. (2016).

En todas las soluciones, los componentes fueron disueltos en 1 litro de agua destilada estéril. Todas las soluciones se prepararon en cámara de flujo laminar y se esterilizaron

en autoclave, el pH fue ajustado a 7.4 empleando hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl) 1N.

Las tres soluciones de extensión fueron suplementadas con ácido L-ascórbico (Vitamina “C”) 5mM, para ello se agregó 0,88 g por cada litro de solución de acuerdo al siguiente cálculo.

$$V_f = 1\text{Lt}$$

$$PM = 176.12\text{g/mol}$$

$$W_{gr} = m = PM \times V_f \times M$$

$$M = \frac{n}{V} = \frac{m}{PM} \frac{1}{V}$$

$$W_{gr} = (176.12\text{g/mol}) \times (1\text{Lt}) \times (5 \times 10^{-3} \text{ M})$$

$$W_{gr} = 0.88 \text{ gr.}$$

5.2.5.2. Evaluación de Crioprotectores Permeables (ACPp), Concentración y Tiempo de Exposición.

Después de determinar la solución de extensión con mejores resultados (Solución salina libre de Calcio + ácido L-ascórbico 5 mM), se evaluaron los crioprotectores permeables (ACPp) con mayor éxito en la criopreservación de langostinos peneidos, referenciados por diversos autores (Lezcano et al., 2004; Salazar et al., 2008; Castelo-Branco et al., 2015; Memon et al., 2012; Yang et al., 2013; Uberti et al., 2014; Chao et al., 2009). Se seleccionaron cuatro crioprotectores permeables por cada estructura reproductiva: Metanol (MeOH), dimetilsulfóxido (DMSO), dicloruro de magnesio (MgCl₂) y 2-propanol.

Los ACPp fueron evaluados a 4 concentraciones: 10, 15, 20 y 30%(v/v), en tres tiempos de exposición 15, 30 y 60 min. Cada tratamiento fue evaluado considerando 5 réplicas, incluido el grupo control, el cual consistió de la estructura reproductiva en SS Ca-free sin ACPp y evaluado en función al tiempo de exposición de acuerdo al diseño experimental

reportado por (Castelo-Branco et al., 2015). Las pruebas se ejecutaron en el laboratorio de Biología Molecular de Marinasol S.A (Sede de Punta Mero-Tumbes).

Para la evaluación de la viabilidad espermática, las muestras fueron enjuagadas dos veces en SS Ca-free y se procedió con la técnica de tinción eosina-nigrosina.

5.2.5.3. Evaluación de Crioprotectores No Permeables (ACPnp)

Con la finalidad de determinar el crioprotector no permeable (ACPnp) menos tóxico para los espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* se evaluó la adición de cuatro ACPnp: manitol, polietilenglicol (PEG), sacarosa y leche descremada (LD). Las concentraciones de los ACPnp fueron establecidas en base a la siguiente bibliografía:

- **Manitol.**- Pertenece al grupo de edulcorantes denominados polioles o polialcoholes. Se empleó a una concentración de 0,5% (w/v) en la criopreservación de la esperma de la “lubina rayada” (Kerby et al., 1983); Además es empleado a 5% como un ACPnp en bacterias (Hubálek, 2003) y en el campo de la criopreservación de glóbulos rojos (Boutron & Peyridieu, 1994).
- **Polietilenglicol.** - También conocido como glicol de polietileno (PEG), es un poliéter con muchas aplicaciones desde la industria manufacturera hasta la industria medica. Se empleó en la criopreservación de la esperma de el lenguado del sur a concentraciones de 5, 10 y 15 % (Hu et al., 2016).
- **Sacarosa.** - Azúcar común o azúcar de mesa es un disacárido formado por alfa-glucopiranososa y beta-fructofuranosa. Este carbohidrato ha sido ampliamente probado en protocolos de criopreservación, en *Litopenaeus vannamei* ha sido evaluado a 0.2 M (Salazar et al., 2008)
- **Leche descremada.** - o desnatada es la leche a la que se le ha eliminado la grasa mediante centrifugado. Se ha reportado en la criopreservación del “Bagre blanco” *Sorubim cuspicaudus* a una concentración de 5% (Pardo-Carrasco et al., 2015)

Durante la experimentación se evaluaron las siguientes concentraciones (Tabla 6):

Tabla 6. Concentraciones de los crioprotectores no permeables* evaluados para el espermatóforo y la masa espermática.

ACPnp.	Espermatóforo (E)	Masa espermática (ME)
Manitol	5%	5%
Polietilenglicol (PEG)	5%	5%
Sacarosa	0.2 M	0.2 M
Leche descremada (LD)**	10%	5%

*Las concentraciones de los ACPnp se determinaron de acuerdo a la relación (w/v), en las concentraciones que emplearon como unidad de medida la molaridad, se consideró la sacarosa con un peso molecular de 342,3 gr/mol.

**Se empleó menos concentración de leche descremada en la masa espermática para evitar saturar la solución crioprotectora por exceso de sólidos totales disueltos (STD), ya que esto dificulta la recuperación de los espermatozoides.

Cada tratamiento fue evaluado considerando 5 réplicas, incluido el grupo control. La viabilidad espermática fue determinada mediante la tinción vital eosina-nigrosina.

5.2.5.4. Primera Evaluación de las Soluciones Crioprotectoras Post-Vitrificación

Una vez determinadas las combinaciones de ACPp y ACPnp menos tóxico para los espermatozoides del espermatóforo (E) y la masa espermática (ME) de *Litopenaeus vannamei*, se procedió a evaluar su efectividad como crioprotector frente al método de vitrificación.

Para la evaluación se congelaron y almacenaron en nitrógeno líquido cinco réplicas por cada tratamiento durante 24 horas, para el grupo control se consideraron 5 réplicas colectadas en SS Ca-free y evaluadas inmediatamente sin congelamiento. La viabilidad espermática fue determinada mediante la tinción vital eosina-nigrosina.

5.2.5.5. Suplementación con Soluciones Complejas y Segunda Evaluación de las Soluciones Crioprotectoras Post-Vitrificación.

Culminadas las evaluaciones anteriores se observó que las soluciones evaluadas (ACPp

+ ACPnp) no permitían un porcentaje aceptable de viabilidad post congelamiento (>70%) tanto para el espermátforo como para la masa espermática, en consecuencia, se optó por la suplementación de la solución crioprotectora con soluciones complejas.

Se evaluaron cuatro soluciones complejas empleadas anteriormente en la criopreservación de especies acuícolas: yema de huevo (del inglés “Egg yolk”) (Lezcano et al., 2004; Salazar et al., 2008; Uberti et al., 2014; Castelo-Branco et al., 2015), extracto crudo de *Aloe vera* (Av) (Melo-Maciel et al., 2015; Souza et al., 2016), Suero Fetal Bovino (SFB) (Robles et al., 2005) y Suero de ternera (del inglés “Calf serum”) (Kurokura, 1979), todas a una concentración de 10% en solución salina libre de calcio (SS Ca-free).

➤ **Preparación de Extracto de *Aloe vera***

La preparación del extracto crudo de *Aloe vera* se realizó de acuerdo a lo reportado por Souza et al. (2016), para ello se extrajo el parénquima de las hojas obteniéndose un gel incoloro, este concentrado fue filtrado a través de un tamiz de tela, para posteriormente ser almacenado en un tubo cónico de centrifuga a 4 °C. Para la ejecución del proyecto esta solución fue diluida al 10% en SS Ca-free.

La técnica de inmersión de la estructura reproductiva en la solución crioprotectora fue modificada en base a la técnica de Salazar et al. (2008). Primeramente, se preparó una solución base que contenía todos los componentes antes determinados con excepción del ACPp ($MgCl_2$), luego se separó la mitad de esta solución en un segundo tubo y se añadió el doble de la concentración del ACPp de manera que este segundo tubo obtuviera el doble de la concentración final. La colecta de la estructura reproductiva se realizó en crioviales conteniendo 250 µl de la solución base, para finalmente adicionar 250 µl de la solución con el doble de la concentración del ACPp, completando así un volumen de 500

μl y alcanzando las concentraciones determinadas para cada componente. El tiempo de exposición se consideró desde la adición de la solución con el crioprotector permeable.

La evaluación de la viabilidad espermática se realizó después de 24 horas de almacenados los crioviales en nitrógeno líquido, considerando cinco replicas por cada tratamiento incluido el grupo control. Se consideró como grupo control el material espermático colectado en SS Ca-free y evaluado inmediatamente sin congelamiento. La viabilidad espermática fue determinada mediante la tinción vital eosina-nigrosina.

5.2.6. Método de Congelamiento - Vitrificación

Transcurrido el tiempo de exposición determinado anteriormente, el congelamiento de los crioviales conteniendo las muestras se llevó a cabo mediante la inmersión dentro del tanque contenedor de nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C.

5.2.7. Protocolo de Descongelamiento y Enjuague

El protocolo de descongelamiento y rehidratación celular de los espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* descritos en el presente trabajo fue desarrollada en base a referencias de protocolos de criopreservación en langostinos peneidos (Diwan & Joseph, 1999; Lezcano et al., 2004; Vuthiphandchai et al., 2007; Salazar et al., 2008; Chao et al., 2009; Memon et al., 2012; Bambozzi et al., 2014; Uberti et al., 2014; Castelo-Branco et al., 2015) y a la experiencia adquirida con los ensayos en laboratorio.

El descongelamiento de la muestra se realizó en un baño maría a una temperatura de 25°C durante 3 min o hasta que la fase sólida se transformara a estado líquido, esto debido a que muchos agentes crioprotectores son tóxicos a temperatura ambiente (Hubálek , 2003), los crioviales fueron inmediatamente centrifugados a 1500 rpm durante 5 minutos (Salazar et al., 2008) para eliminar la solución con crioprotectores y recuperar las estructuras reproductivas. Para la rehidratación de la muestra se realizó un doble

lavado y enjuague en SS Ca-free + sacarosa 0.2 M durante un tiempo de 10 min (en el caso del espermatóforo se realizó la extracción de la masa espermática antes de la rehidratación). La viabilidad de las células espermáticas fue determinada mediante la tinción vital eosina-nigrosina.

Las láminas evaluadas en este ensayo mostraron abundante cantidad de grumos y estructuras cristaloides en los campos microscópicos a 400X, por lo que se observaron laminas con solución de sacarosa 0.2 M y otra con Yema de huevo 10 % en SS Ca free para determinar la formación de artefactos.

5.2.8. Inseminación artificial (IA) con Espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* Criopreservados.

Con la finalidad de determinar la fertilidad de los espermatozoides provenientes de espermatóforos (E) criopreservados con el método de vitrificación y resolver la incógnita con respecto a la viabilidad del empleo de *Aloe vera* como solución compleja, se realizó un ensayo de inseminación artificial (IA) con espermatozoides criopreservados durante 7 días en nitrógeno líquido y espermatozoides frescos como grupo control.

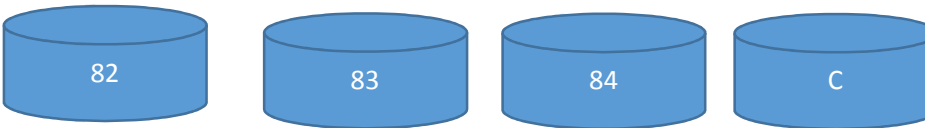
Para esta evaluación se descongelaron los espermatóforos con los mejores protocolos de criopreservación evaluados durante las fases anteriores.

Las hembras ablacionadas fueron seleccionadas del área de maduración, estas presentaban signos de madurez sexual determinadas por el tamaño, peso y presencia del cordón dorsal. Las hembras seleccionadas fueron inseminadas con la masa espermática extraída de dos espermatóforos por hembra. Posteriormente, las hembras inseminadas fueron lavadas en agua dulce para disminuir la carga bacteriana. Las hembras fueron colocadas en los tanques (1hembra/tanque) a partir de las 4:00 pm a una temperatura de 29°C y sin aireación. A las 8:00 pm se realizó una revisión de las hembras incubadas con la finalidad de evaluar si la masa espermática permanecía adosada al télico, en caso

contrario se volvía a inseminar a la hembra colocando la misma masa espermática sobre el telico. A la media noche se verificó el desove, se desinfectaron las ovas con yodo (yodóforo) 1% y se procedió al conteo de las ovas. Posteriormente, las ovas fueron incubadas en los tanques de eclosión con aireación a una temperatura de 30°C con ayuda de un calefactor. A las 3:00 pm del día siguiente se realizó la evaluación de la eclosión de los nauplios, la recolección de los nauplios se realizó aprovechando el fototactismo positivo de las larvas, finalmente se realizó el conteo de los nauplios y la determinación del porcentaje de eclosión. El procedimiento de inseminación artificial estuvo de acuerdo a lo descrito en el Manual de reproducción y cultivo del camarón blanco (Husien & Aguillón, 2008).

A continuación, se detalla el diseño experimental y los códigos de las hembras maduras de *Litopenaeus vannamei* inseminadas durante el ensayo (Tabla 7).

Tabla 7. Diseño experimental del ensayo de inseminación artificial (IA).



Métodos de congelamiento	Vitrificación	Vitrificación	Vitrificación	CONTROL
Solución Crioprotectora	Aloe vera 10% Leche descremada 10% y MgCl ₂ 15% en SS Ca-free.	yema de huevo 10% Sacarosa 0.2 M y MgCl ₂ 15% en SS Ca-free.	SFB 10% Sacarosa 0.2 M y MgCl ₂ 15% en SS Ca-free.	----
Hembras	201 naranja 6to derecho rojo	333 Rosado 1ra izquierda azul	293 naranja 1ra izquierda azul	213 naranja 1ra izquierda rojo

La metodología empleada para el grupo control y los tratamientos fue exactamente la misma. Debido a la logística que implica hacer pruebas de inseminación artificial en *Litopenaeus vannamei* (manejo de temperatura, salinidad, tanques de desove, oxigenación, hembras copuladas, etc.) no se realizaron replicas.

El conteo del número de embriones se realizó mediante el método volumétrico el cual consistió en homogenizar un volumen de agua determinado (15 L) conteniendo los embriones colectados y tomar una muestra de 1ml con una pipeta de vidrio, el conteo se realizó por triplicado contra una fuente de luz, el conteo volumétrico de nauplios se realizó de manera similar. Adicionalmente, se realizó la observación de muestras en el microscopio para determinar anomalías morfológicas durante el desove y la eclosión de los nauplios.

5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos de la evaluación de la viabilidad espermática en las pruebas de toxicidad celular y criopreservación se expresaron como promedio \pm desviación estándar (DE). La normalidad de los datos se evaluó empleando las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk (Castelo-Branco, 2010; Lezcano et al., 2004), mientras que la homogeneidad de varianzas se determinó empleando el test de Levene (Castelo-Branco, 2010). Los datos que no mostraron una distribución normal fueron transformados empleando la transformación angular (arcoseno de la raíz cuadrada de "x") (Nimrat et al., 2006; Uberti et al., 2014; Castelo-Branco et al., 2015).

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos se empleó la prueba paramétrica de análisis de varianza (ANOVA). Los tratamientos cuyos datos transformados no tuvieron una distribución normal fueron analizados con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (K-W) (Castelo-Branco, 2010). Los análisis post hoc se realizaron empleando el Test de Tukey (Castelo-Branco, 2010; Morales et al., 2013).

Se consideró un nivel de significancia $\alpha < 0.05$ para todos los test estadísticos aplicados. El procesamiento de los datos se ejecutó con el paquete estadístico IBM SPSS Statistic 21

para Windows y para la elaboración de gráficos se empleó el software GRAPHPAD PRISM 6.0.

6. RESULTADOS

La formulación de los protocolos de criopreservación se muestra por separado para el espermátforo y la masa espermática.

6.1. Extracción de Material Espermático

Los espermátforos de los ejemplares empleados durante la ejecución del proyecto mostraron como características visuales un color blanco lechoso, ausencia de melanización y un peso promedio de 0.0275 ± 0.0092 gr (n=42), el peso del espermátforo derecho e izquierdo no mostraron diferencias significativas en cuanto al peso. La masa espermática extraída de los espermátforos frescos poseía un color blanquecino y consistencia pegajosa.

Las características físicas del espermátforo y la masa espermática posterior al descongelamiento variaron en cuanto a la adhesividad y volumen, encontrándose un aumento en el volumen de ambas estructuras reproductivas después del descongelamiento y siendo la masa espermática extraída del espermátforo criopreservado más pegajosa con respecto a la masa espermática directamente criopreservada.

6.2. Protocolos de Criopreservación para el ESPERMATÓFORO (E)

6.2.1. Determinación de la Solución de Extensión

Los resultados de la evaluación de las soluciones de extensión para el espermátforo mostraron que los espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* mantienen su estructura e integridad de membrana con la solución de extensión solución salina libre de calcio (SS-Ca-free) con un $76.40 \pm 9.06\%$ de células espermáticas viables después de 12 horas a

temperatura ambiente ($p < 0.05$). Los tratamientos con la solución de Ringer (SR) y la solución buffer fosfato (SBP), obtuvieron los valores más bajos de viabilidad espermática con $12.56 \pm 9.75\%$ y $6.08 \pm 3.15\%$, respectivamente ($p < 0.05$). El grupo control (SSW) obtuvo un porcentaje de viabilidad de $91.68 \pm 4.07\%$ ($p < 0.05$). Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 8 (Figura 9).

Tabla 8. Porcentaje de espermatozoides viables (promedio \pm desviación estándar) en los espermatóforos de *Litopenaeus vannamei* almacenados durante 12 horas en diferentes medios de extensión.

Estructura reproductiva	Soluciones de extensión			
	*CONTROL	SS Ca-free	SR	SBP
Espermatóforo	91.68 ± 4.07^a	76.40 ± 9.06^b	12.56 ± 9.75^c	6.08 ± 3.15^c

Diferentes letras superindicadas en los resultados indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). SS Ca-free: solución salina libre de calcio; SR: solución de Ringer; SBP: solución buffer fosfato.

*El grupo control consistió de muestras mantenidas en SSW: agua de mar estéril.

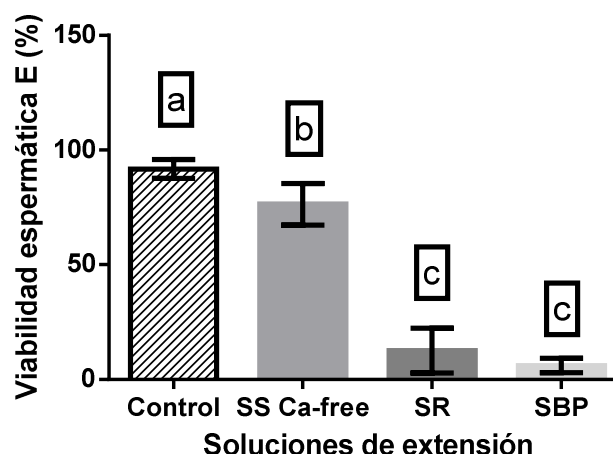


Figura 9. Efecto de la solución de extensión sobre la viabilidad espermática del espermatóforo de *Litopenaeus vannamei*, transcurridos 12 horas de almacenamiento a temperatura ambiente.

Control: Agua de mar estéril (SSW); Solución salina libre de Calcio (SS Ca-free); Solución de Ringer (SR); Solución buffer fosfato (SBP). Los datos son presentados como barras (media \pm DE, $n = 20$ espermatóforos). Diferentes letras en la parte superior de las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

6.2.2. Determinación de las Combinaciones de Crioprotector Permeable, Concentración y Tiempo de Exposición.

Las pruebas de citotoxicidad mostraron que el porcentaje de viabilidad espermática decrece significativamente a medida que aumenta la concentración del crioprotector, de la misma manera ocurre cuando el tiempo de exposición se prolonga ($p < 0.05$). La viabilidad espermática de todos los crioprotectores permeables incubados durante 15 min de exposición en todos los niveles de concentración resultó en porcentajes de sobrevivencia superiores al 85%, excepto para el 2-propanol (Tabla N° 12). El porcentaje de viabilidad más elevado resultó del tratamiento usando $MgCl_2$ a una concentración de 15% durante 15 min ($98.00 \pm 0.89\%$) ($p < 0.05$). El grupo control resultó en porcentajes de viabilidad superiores al 95%, no hubo diferencias significativas sobre la viabilidad con respecto a los tiempos de exposición evaluados. A continuación, se detallan los resultados de las evaluaciones para cada crioprotector permeable.

A. Metanol (MeOH)

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados con MeOH a diferentes concentraciones durante 15 min. La viabilidad espermática de los tratamientos evaluados durante 30 y 60 min de exposición fueron significativamente más bajas con respecto a los tratamientos de 15 min ($p < 0.05$). El porcentaje de viabilidad más bajo resultó del tratamiento usando una concentración de 10% durante 60 min ($69.20 \pm 15.89\%$) ($p < 0.05$). Los espermátóforos evaluados a 30% de concentración durante todos los tiempos de exposición resultaron en porcentajes de viabilidad significativamente iguales o superiores con respecto a los tratamientos con menor concentración ($p < 0.05$). (Tabla 9) (Figura 10).

Tabla 9. Porcentaje de espermatozoides viables (promedio \pm desviación estándar) en los espermatóforos de *Litopenaeus vannamei* evaluados con Metanol (MeOH).

Crioprotector (%)	Tiempo de Exposición (min)		
	15	30	60
Metanol (MeOH)			
10	92.80 \pm 04.52 ^{abcd}	79.20 \pm 04.37 ^{def}	69.20 \pm 15.89 ^f
15	88.96 \pm 01.91 ^{abcde}	83.20 \pm 04.29 ^{bcdef}	75.52 \pm 05.67 ^{ef}
20	86.64 \pm 06.33 ^{abcde}	81.92 \pm 08.52 ^{cdef}	79.12 \pm 13.23 ^{def}
30	89.20 \pm 04.96 ^{abcde}	86.64 \pm 02.33 ^{abcde}	84.96 \pm 05.06 ^{abcde}
*CONTROL	97.28 \pm 02.14 ^{ab}	98.96 \pm 00.22 ^a	96.56 \pm 01.22 ^{abc}

Diferentes letras superindicadas en los resultados indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

*Se consideró como grupo control la evaluación de espermatozoides frescos empleando como medio diluyente la solución salina libre de calcio.

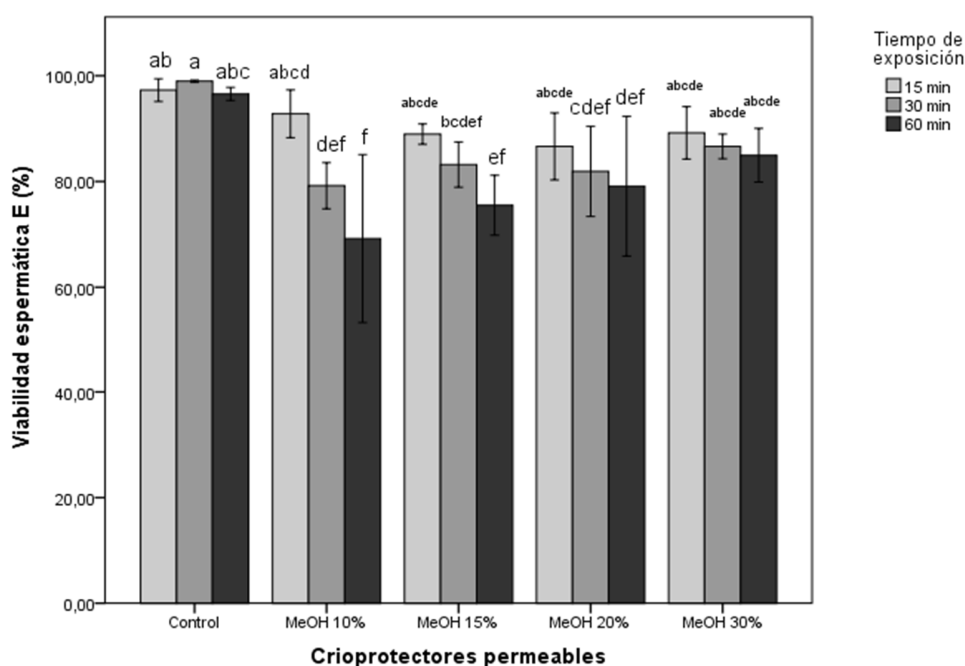


Figura 10. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de la citotoxicidad del metanol (MeOH) sobre los espermatóforos de *Litopenaeus vannamei* (promedio \pm DE) ($p < 0.05$).

B. Dimetilsulfóxido (DMSO)

Los espermatoforos tratados con todas las concentraciones de DMSO durante 15 min de exposición no mostraron diferencias significativas entre sí ($p < 0.05$). Los porcentajes de viabilidad significativamente más bajos resultaron de los tratamientos evaluados durante 60 min de exposición usando 10% y 30 % de concentración ($75.17 \pm 08.60\%$ y 77.04 ± 05.44 respectivamente) ($p < 0.05$), sin embargo, la viabilidad espermática de los tratamientos evaluados para el mismo tiempo de exposición con 15% y 20% de concentración no fue significativamente diferente del grupo control ($p < 0.05$). El porcentaje de viabilidad más elevado resultó del tratamiento durante 30 min de exposición usando 20 % de concentración ($96.08 \pm 01.48\%$), no obstante, no fue significativamente diferente de los tratamientos evaluados durante 15 min de exposición ($p < 0.05$). (Tabla 10) (Figura 11).

Tabla 10. Porcentaje de espermatozoides viables (promedio \pm desviación estándar) en los espermatoforos de *Litopenaeus vannamei* evaluados con dimetilsulfóxido (DMSO).

Crioprotector (%)	Tiempo de Exposición (min)		
	15	30	60
Dimetilsulfóxido (DMSO)			
10	91.12 ± 03.35^{abc}	81.12 ± 05.20^{cd}	75.17 ± 08.60^d
15	95.04 ± 01.40^{ab}	92.80 ± 01.20^{ab}	90.16 ± 01.31^{abc}
20	90.32 ± 14.08^{abc}	96.08 ± 01.48^{ab}	88.96 ± 05.37^{abc}
30	92.32 ± 02.50^{abc}	85.12 ± 04.17^{bcd}	77.04 ± 05.44^d
*CONTROL	97.28 ± 02.14^a	98.96 ± 00.22^a	96.56 ± 01.22^{ab}

Diferentes letras superindicadas en los resultados indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

*Se consideró como grupo control la evaluación de espermatozoides frescos empleando como medio diluyente la solución salina libre de calcio.

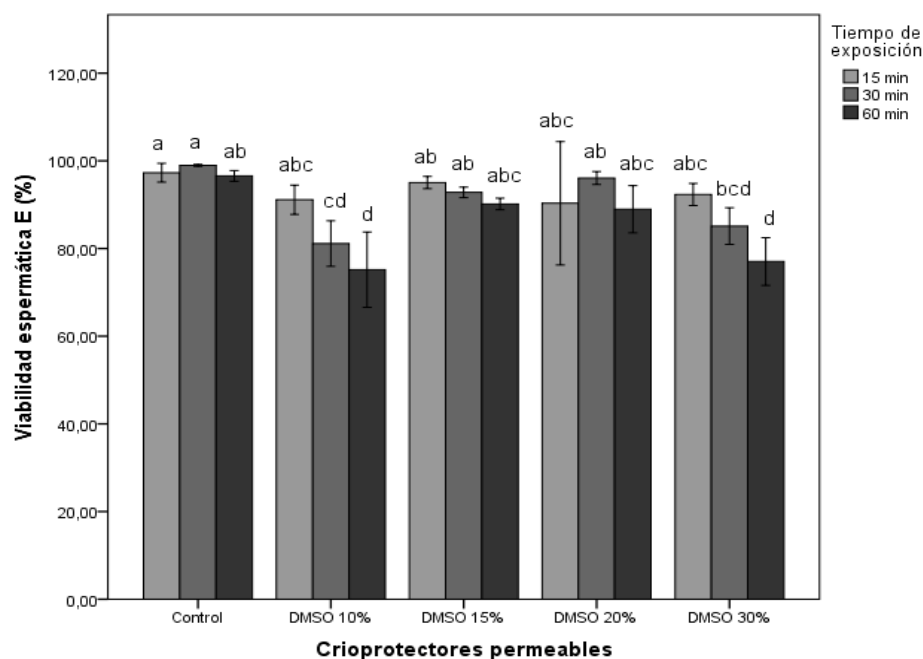


Figura 11. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de la citotoxicidad del dimetilsulfóxido sobre los espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* (promedio \pm DE) ($p < 0.05$).

C. Dicloruro de magnesio ($MgCl_2$)

Los tratamientos evaluados durante 30 min de exposición en todas las concentraciones fueron significativamente diferentes con respecto al grupo control ($p < 0.05$). El porcentaje de viabilidad espermática más elevado resultó del tratamiento a una concentración de 15% y tiempo de exposición de 15 min ($98.00 \pm 00.89\%$). No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de viabilidad espermática de todos los tratamientos evaluados de 10 a 20% de concentración con respecto al grupo control, excepto por el tratamiento evaluado durante 30 min de exposición usando 15 % de concentración, el cual resultó en el porcentaje de viabilidad significativamente más bajo ($81.60 \pm 01.33\%$) ($p < 0.05$). (Tabla 11) (Figura 12).

Tabla 11. Porcentaje de espermatozoides viables (promedio \pm desviación estándar) en los espermátóforos de *Litopenaeus vannamei* evaluados con dicloruro de magnesio (MgCl₂).

Crioprotector (%)	Tiempo de Exposición (min)		
	15	30	60
Dicloruro de Mg (MgCl ₂)			
10	97.20 \pm 00.75 ^a	95.12 \pm 02.18 ^{ab}	96.16 \pm 00.46 ^a
15	98.00 \pm 00.89 ^a	81.60 \pm 01.33 ^d	97.36 \pm 00.83 ^a
20	95.84 \pm 02.51 ^{ab}	95.68 \pm 01.98 ^{ab}	90.96 \pm 02.13 ^{abc}
30	84.96 \pm 04.99 ^{cd}	86.73 \pm 10.92 ^{cd}	87.84 \pm 04.51 ^{bcd}
*CONTROL	97.28 \pm 02.14 ^a	98.96 \pm 00.22 ^a	96.56 \pm 01.22 ^a

Diferentes letras superindicadas en los resultados indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

*Se consideró como grupo control la evaluación de espermatozoides frescos empleando como medio diluyente la solución salina libre de calcio.

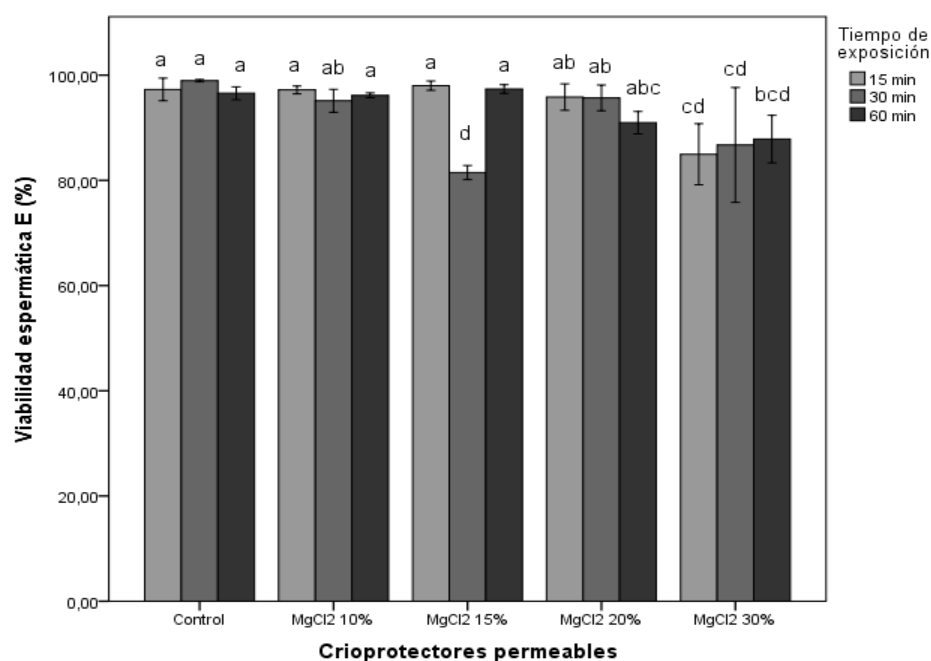


Figura 12. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de la citotoxicidad del dicloruro de magnesio sobre los espermátóforos de *Litopenaeus vannamei* (promedio \pm DE) ($p < 0.05$).

D. 2-propanol

No se encontró espermatozoides viables ($< 3\%$) cuando los espermátóforos fueron evaluados en todos los tiempos de exposición a concentraciones iguales o superiores a 15% ($p < 0.05$).

El porcentaje de viabilidad más elevado resultó del tratamiento usando una concentración

de 10% durante 15 min ($81.19 \pm 08.81\%$), no obstante, este resultado fue significativamente diferente del grupo control ($p < 0.05$). (Tabla 12) (Figura 13).

Tabla 12. Porcentaje de espermatozoides viables (promedio \pm desviación estándar) en los espermátóforos de *Litopenaeus vannamei* evaluados con 2-propanol.

Crioprotector (%)	Tiempo de Exposición (min)		
	15	30	60
2-propanol			
10	81.19 ± 08.81^b	59.92 ± 21.66^c	44.32 ± 13.03^c
15	01.52 ± 03.18^d	00.98 ± 00.18^d	02.72 ± 01.53^d
20	00.24 ± 00.36^d	00.00 ± 00.00^d	00.00 ± 00.00^d
30	00.78 ± 01.34^d	00.00 ± 00.00^d	00.00 ± 00.00^d
*CONTROL	97.28 ± 02.14^a	98.96 ± 00.22^a	96.56 ± 01.22^{ab}

Diferentes letras superindicadas en los resultados indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

*Se consideró como grupo control la evaluación de espermatozoides frescos empleando como medio diluyente la solución salina libre de calcio.

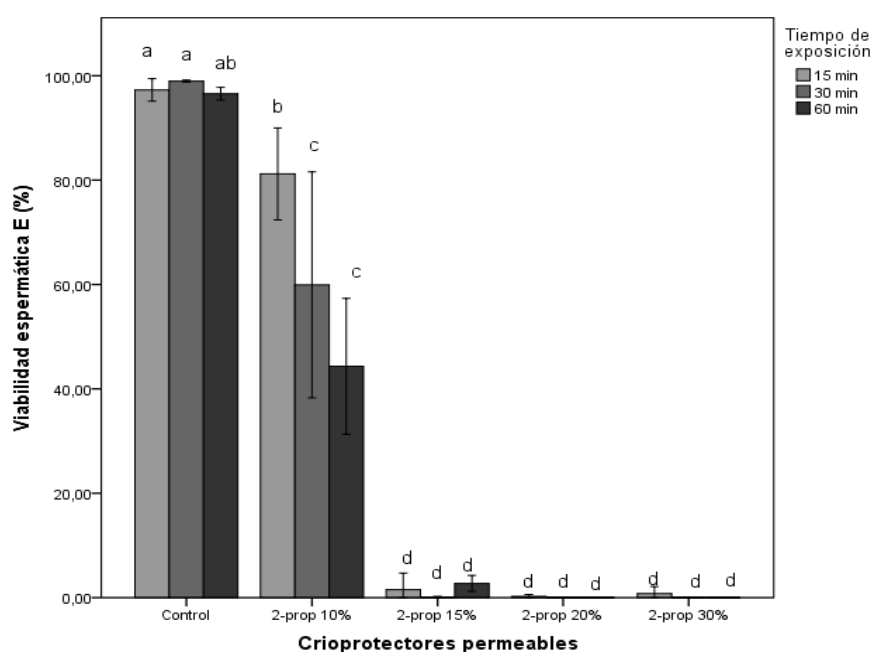


Figura 13. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de la citotoxicidad del 2-propanol sobre los espermátóforos de *Litopenaeus vannamei* (promedio \pm DE) ($p < 0.05$).

Los resultados encontrados durante esta fase de la experimentación para el espermátforo (E) permitieron seleccionar los siguientes tratamientos (ACPp x concentración x tiempo de exposición):

- ✓ MgCl_2 10%15min.
- ✓ DMSO 20%15min.
- ✓ MeOH 30%15min.

No se seleccionaron tratamientos para el 2-propanol debido a que la citotoxicidad de este crioprotector no permite la sobrevivencia de espermia viable para *Litopenaeus vannamei*.

6.2.3. Determinación del Crioprotector No Permeable (ACPnp)

Los resultados en cuanto a la citotoxicidad de la adición de los crioprotectores no permeables a las combinaciones determinadas por los resultados anteriores (MgCl_2 10% 15min, DMSO 20% 15min y MeOH 30% 15min) mostraron que el tratamiento con manitol disminuyó significativamente la viabilidad espermática en todas las combinaciones, con un porcentaje de sobrevivencia celular inferior a 60% ($p < 0.05$). El uso de leche descremada en combinación con DMSO, MgCl_2 y MeOH resultó en porcentajes de viabilidad significativamente similares al grupo control, mientras que con el uso de polietilenglicol se observaron los mismos resultados que el tratamiento con leche descremada excepto para el MeOH ($p < 0.05$). Por otra parte, la sacarosa resultó en porcentajes de viabilidad similares al grupo control únicamente en combinación con DMSO. El tratamiento con DMSO obtuvo los porcentajes de viabilidad más elevados en todas las combinaciones con los crioprotectores no permeables, seguido siempre del MgCl_2 . Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 13 (Figura 14).

Tabla 13. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de la citotoxicidad de las soluciones crioprotectoras (ACPp +ACPnp) para los espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* (promedio \pm DE).

Solución crioprotectora		Citotoxicidad
		Viabilidad espermática (%)
LD 10%	DMSO 20% 15 min	78.32 \pm 08.12 ^{abc}
	MgCl ₂ 10% 15 min	83.84 \pm 05.38 ^{ab}
	MeOH 30% 15min	77.04 \pm 04.03 ^{abc}
PEG 5%	DMSO 20% 15 min	80.64 \pm 05.02 ^{abc}
	MgCl ₂ 10% 15 min	70.24 \pm 14.18 ^{abcd}
	MeOH 30% 15min	63.60 \pm 12.03 ^{bcd}
Sacarosa 0.2M	DMSO 20% 15 min	75.12 \pm 06.67 ^{abc}
	MgCl ₂ 10% 15 min	48.60 \pm 12.67 ^{de}
	MeOH 30% 15min	08.40 \pm 08.92 ^f
Manitol 5%	DMSO 20% 15 min	58.32 \pm 08.77 ^{cd}
	MgCl ₂ 10% 15 min	31.12 \pm 14.31 ^{ef}
	MeOH 30% 15min	30.72 \pm 25.81 ^{ef}
*CONTROL		88.40 \pm 03.47 ^a

Diferentes letras superindicadas en los resultados indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). LD: leche descremada, PEG: polietilenglicol.

* El grupo control consistió en espermatozoides frescos ($n=5$) en solución salina libre de calcio (SS Ca-free) durante un tiempo de exposición de 15 minutos.

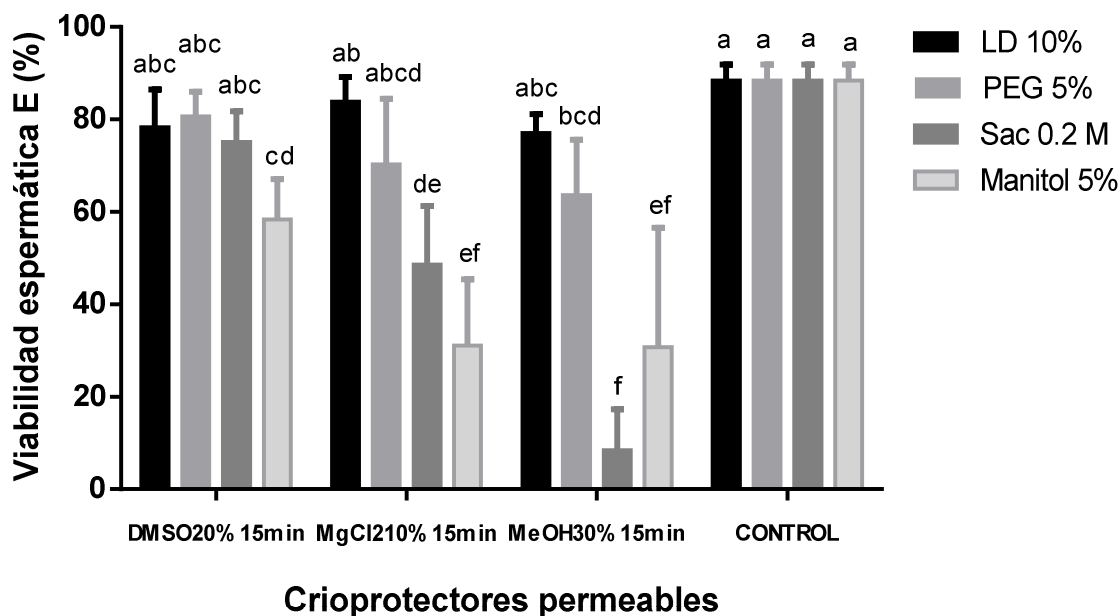


Figura 14. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de citotoxicidad de las soluciones crioprotectoras (ACPp +ACPnp) para los espermátóforos de *Litopenaeus vannamei* (promedio \pm DE).

Control: Solución salina libre de calcio (SS Ca-free); LD: leche descremada, PEG: polietilenglicol, Sac: Sacarosa. Los datos son presentados como barras (media \pm DE, $n = 65$ espermátóforos). Diferentes letras en la parte superior de las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Los resultados encontrados durante esta fase de la experimentación para el espermátóforo (E) permitieron seleccionar los siguientes tratamientos:

- ✓ $MgCl_2$ 10%15min + Leche descremada 10%
- ✓ DMSO 20%15min + Leche descremada 10%
- ✓ MeOH 30%15min + Leche descremada 10%

6.2.3.1. Evaluación Post-Vitrificación

Los resultados para el espermátóforo (E) muestran que a pesar de que las combinaciones conformadas por agentes crioprotectores permeables y no permeables no son tóxicas para las células espermáticas estas no protegen efectivamente los

espermatozoides durante el proceso de vitrificación (Tabla 14). La combinación de MgCl₂ y leche descremada obtuvo un porcentaje de viabilidad (16.32 ± 11.31%) significativamente más elevado con respecto al control (p<0.05). (Figura 15).

Tabla 14. Porcentajes de viabilidad espermática post vitrificación de las soluciones crioprotectoras (ACPP + ACPnp) para los espermatoóforos de *Litopenaeus vannamei* (promedio ± DE).

Solución crioprotectora	Vitrificación
	Viabilidad espermática (%)
Leche descremada 10%	
MgCl ₂ 10% 15 min	16.32 ± 11.31
DMSO 20% 15 min	00.48 ± 00.18
MeOH 30% 15min	00.56 ± 00.22
*CONTROL	00.40 ± 00.00

*El grupo control consistió en esperma congelada en solución salina libre de calcio (SS Ca-free) sin crioprotectores. MgCl₂: dicloruro de magnesio, DMSO: dimetilsulfóxido, MeOH: metanol (p<0.05).

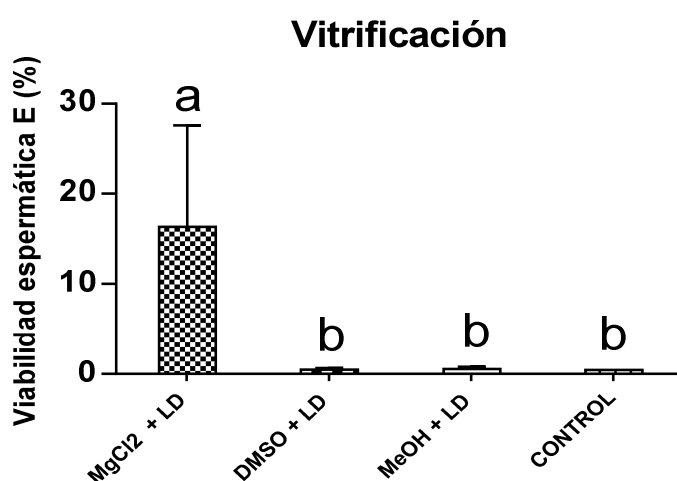


Figura 15. Viabilidad espermática en el espermatoóforo de *Litopenaeus vannamei* después de la vitrificación con soluciones crioprotectoras (ACPP + ACPnp).

Control: esperma congelada en solución salina libre de calcio (SS Ca-free). Los datos son presentados como barras (media ± DE, n = 20 espermatoóforos). Diferentes letras en la parte superior de las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos (p<0.05).

6.2.4. Determinación de la Solución Compleja (SC) Post-Vitrificación

Los resultados de la viabilidad espermática post-vitrificación de las soluciones conformadas por crioprotectores permeables, crioprotectores no permeables y soluciones complejas (SC) mostraron promedios de viabilidad espermática altamente variables para el espermátforo (E) de *Litopenaeus vannamei*. Las soluciones conformadas por el $MgCl_2$ y leche descremada suplementadas indistintamente con las soluciones complejas resulto en porcentajes de viabilidad superiores al 70 %, alcanzado un máximo de 85.12 ± 04.69 % de espermatozoides viables con el extracto de *Aloe vera*. Las combinaciones empleando el MeOH como crioprotector permeable resultaron en porcentajes de viabilidad significativamente más bajos (<5%), alcanzado su más alto porcentaje de viabilidad en combinación con la yema de huevo (13.20 ± 12.14 %). Las soluciones conformadas por DMSO resultaron en bajos porcentajes de viabilidad (<6%) con excepción de la combinación con suero de ternera (60.00 ± 11.45 %). Los grupos control resultaron en promedios de viabilidad espermática menores al 6% ($p < 0.05$). Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 15 (Figura 16)

Tabla 15. Porcentajes de viabilidad espermática post vitrificación de las soluciones crioprotectoras (ACPP + ACPnp + SC) para los espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* (promedio \pm DE).

Solución crioprotectora		Vitrificación
		Viabilidad espermática (%)
Yema de huevo 10%		
	MgCl ₂ 10% 15 min + LD 10%	78.24 \pm 10.16
	DMSO 20% 15 min + LD 10%	02.56 \pm 00.67
	MeOH 30% 15min+ LD10%	13.20 \pm 12.14
Aloe vera 10%		
	MgCl ₂ 10% 15 min + LD 10%	85.12 \pm 04.69
	DMSO 20% 15 min + LD 10%	05.36 \pm 01.28
	MeOH 30% 15min+ LD10%	01.52 \pm 00.69
Suero fetal bovino 10%		
	MgCl ₂ 10% 15 min + LD 10%	71.44 \pm 12.28
	DMSO 20% 15 min + LD 10%	05.36 \pm 01.49
	MeOH 30% 15min+ LD10%	01.04 \pm 00.36
Suero de ternera 10%		
	MgCl ₂ 10% 15 min + LD 10%	70.96 \pm 03.68
	DMSO 20% 15 min + LD 10%	60.00 \pm 11.45
	MeOH 30% 15min+ LD10%	04.00 \pm 03.85
*CONTROL		
	Yema de huevo 10%	3.12 \pm 03.46
	Aloe vera 10%	1.76 \pm 01.59
	Suero fetal bovino 10%	1.20 \pm 00.40
	Suero de ternera 10%	5.04 \pm 02.66

* El grupo control consistió en espermatozoides congelados en solución salina libre de calcio (SS Ca-free) + soluciones complejas. MgCl₂: dicloruro de magnesio, DMSO: dimetilsulfóxido, MeOH: metanol ($p < 0.05$).

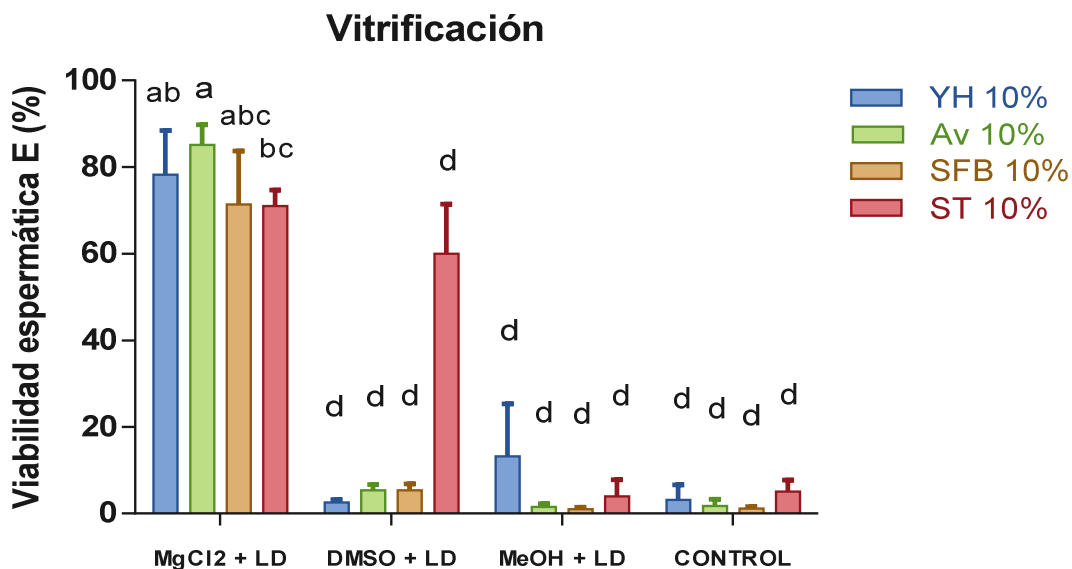


Figura 16. Viabilidad espermática en el espermatóforo de *Litopenaeus vannamei* después de la vitrificación con soluciones crioprotectoras (ACPP + ACPnp +SC).

Control: espermatozoos congelados en soluciones complejas (SC). Los datos son presentados como barras (media \pm DE, $n = 80$ espermatozoos). Diferentes letras en la parte superior de las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Durante la evaluación de los tratamientos con yema de huevo se observaron estructuras esféricas de naturaleza oleosa similares a las células espermáticas de *Litopenaeus vannamei* las cuales dificultaban el conteo celular, no obstante, estas fueron diferenciables por la ausencia de la espina y por poseer una refringencia distinta a los espermatozoides.

De los datos encontrados se seleccionó como solución crioprotectora óptima para el espermatóforo (E) el siguiente tratamiento:

- ✓ MgCl_2 15%30min + Leche descremada 10% + Aloe vera 10% ($\text{VE}^* = 85.12 \pm 04.69\%$)

* VE: Viabilidad espermática.

6.3. Protocolo de Criopreservación para la MASA ESPERMÁTICA (ME)

6.3.1. Determinación de la Solución de Extensión

Los resultados de la evaluación de las soluciones de extensión para la masa espermática mostraron que los espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* mantienen su estructura e integridad de membrana con la solución de extensión solución salina libre de calcio con un $80.86 \pm 12.19\%$ de células espermáticas viables después de 12 horas a temperatura ambiente, siendo este porcentaje significativamente similar al del grupo control ($91.68 \pm 4.07\%$). Los tratamientos con la solución de Ringer y la solución buffer fosfato, obtuvieron los valores más bajos de viabilidad espermática con $3.92 \pm 1.40\%$ y $5.52 \pm 4.43\%$ respectivamente. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 16 (Figura 17)

Tabla 16. Porcentaje de espermatozoides viables (promedio \pm desviación estándar) en las masas espermáticas de *Litopenaeus vannamei* almacenados durante 12 horas en diferentes medios de extensión.

Estructura reproductiva	Soluciones de extensión			
	CONTROL	SS Ca-free	SR	SBP
Masa espermática	91.68 ± 4.07^a	80.88 ± 12.20^a	3.92 ± 1.40^b	5.52 ± 4.43^b

Diferentes letras superindicadas en los resultados indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). SS Ca-free: solución salina libre de calcio; SR: solución de Ringer; SBP: solución buffer fosfato.

*El grupo control consistió de muestras mantenidas en SSW: agua de mar estéril.

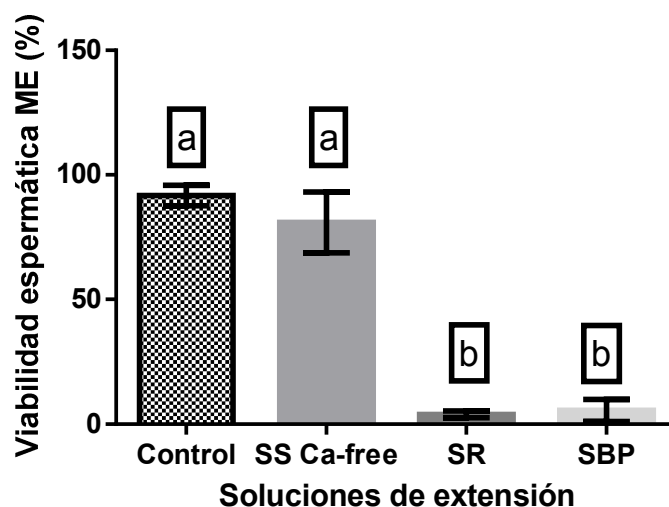


Figura 17. Efecto de la solución de extensión sobre la viabilidad espermática de la masa espermática de *Litopenaeus vannamei*, transcurridos 12 horas de almacenamiento a temperatura ambiente.

Control: Agua de mar estéril (SSW); Solución salina libre de Calcio (SS Ca-free); Solución de Ringer (SR); Solución buffer fosfato (SBP). Los datos son presentados como barras (media \pm DE, $n = 20$ masas espermáticas). Diferentes letras en la parte superior de las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

6.3.2. Determinación de las Combinaciones de Crioprotector Permeable, Concentración y Tiempo de Exposición.

Las pruebas de citotoxicidad mostraron que el porcentaje de viabilidad espermática decrece significativamente a medida que aumenta la concentración del crioprotector, de la misma manera ocurre cuando el tiempo de exposición se prolonga. La viabilidad de los espermatozoides tratados con 2-propanol a varias concentraciones y tiempos de exposición fueron significativamente más bajos en comparación con las otras soluciones ($p < 0.05$). El grupo control mostró porcentajes de viabilidad superiores al 90%, no existió un efecto significativo sobre la viabilidad con respecto al tiempo de exposición ($p < 0.05$).

A. Metanol (MeOH)

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados a una concentración de 10% en los diferentes tiempos de exposición ($p < 0.05$). Los espermátóforos evaluados para todos los tiempos de exposición a concentraciones

superiores al 10% resultaron en porcentajes de viabilidad (56%-0%) significativamente inferiores con respecto al grupo control ($p<0.05$). (Tabla 17) (Figura 18).

Tabla 17. Porcentaje de espermatozoides viables (promedio \pm desviación estándar) en la masa espermática de *Litopenaeus vannamei* evaluados con metanol (MeOH).

Crioprotector (%)	Tiempo de Exposición (min)		
	15	30	60
Metanol (MeOH)			
10	77.92 \pm 03.36 ^{ab}	75.84 \pm 00.83 ^{ab}	76.88 \pm 04.30 ^{ab}
15	56.00 \pm 31.93 ^b	20.96 \pm 21.27 ^c	24.56 \pm 17.98 ^c
20	16.24 \pm 08.33 ^c	06.80 \pm 04.96 ^c	05.20 \pm 04.87 ^c
30	02.80 \pm 04.38 ^c	08.24 \pm 08.55 ^c	00.24 \pm 00.22 ^c
*CONTROL	96.00 \pm 02.84 ^a	93.92 \pm 03.66 ^a	96.00 \pm 02.33 ^a

Diferentes letras superindicadas en los resultados indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p<0.05$).

*Se consideró como grupo control la evaluación de espermatozoides frescos empleando como medio diluyente la solución salina libre de calcio.

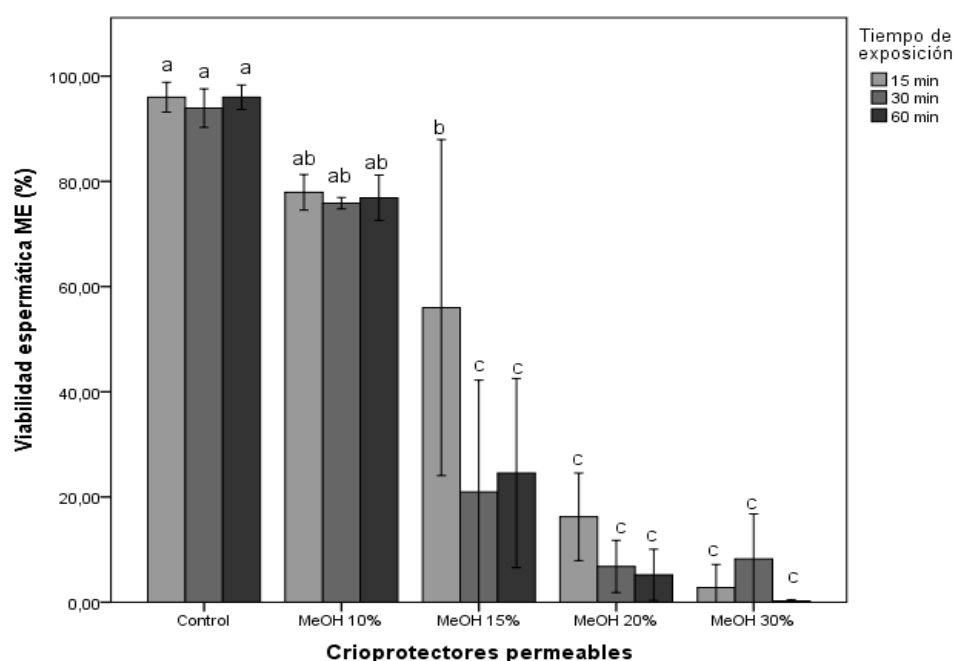


Figura 18. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de la citotoxicidad del metanol sobre la masa espermática de *Litopenaeus vannamei* (promedio \pm DE) ($p<0.05$).

B. Dimetilsulfóxido (DMSO)

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados para todos

los tiempos de exposición a niveles de 10- 20 % de concentración, sin embargo, se observó una disminución significativa de la viabilidad espermática a concentraciones de 30% y tiempos de exposición superiores a los 20 min ($p<0.05$). El porcentaje de viabilidad significativamente más bajo resultó del tratamiento durante 60 min de exposición usando 30 % de concentración ($76.32 \pm 08.28\%$) ($p<0.05$). (Tabla 18) (Figura 19).

Tabla 18. Porcentaje de espermatozoides viables (promedio \pm desviación estándar) en la masa espermática de *Litopenaeus vannamei* evaluados con dimetilsulfóxido (DMSO).

Crioprotector (%)	Tiempo de Exposición (min)		
	15	30	60
Dimetilsulfóxido (DMSO)			
10	96.96 ± 02.13^a	93.84 ± 02.24^{ab}	95.60 ± 02.06^a
15	94.72 ± 02.25^{ab}	93.76 ± 02.78^{ab}	92.72 ± 03.04^{ab}
20	95.44 ± 03.08^a	94.08 ± 04.24^{ab}	89.72 ± 05.02^{ab}
30	90.80 ± 04.29^{ab}	84.96 ± 08.25^{bc}	76.32 ± 08.28^c
*CONTROL	96.00 ± 02.84^a	93.92 ± 03.66^{ab}	96.00 ± 02.33^a

Diferentes letras superindicadas en los resultados indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p<0.05$).

*Se consideró como grupo control la evaluación de espermatozoides frescos empleando como medio diluyente la solución salina libre de calcio.

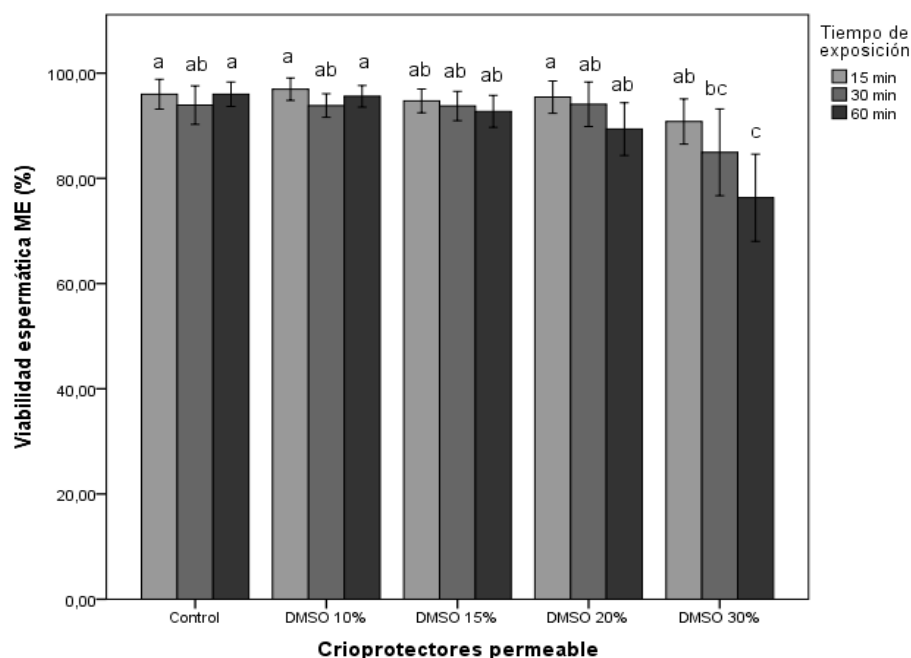


Figura 19. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de la citotoxicidad del dimetilsulfóxido sobre la masa espermática de *Litopenaeus vannamei* (promedio \pm DE) ($p<0.05$).

C. Dicloruro de magnesio (MgCl₂)

Únicamente no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento a una concentración de 10% y tiempo de exposición de 15 minutos con respecto al grupo control ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados a una concentración de 10% en tiempos de exposición de 30 y 60 min, sin embargo estos valores fueron significativamente menores con respecto al grupo control. Los espermatóforos evaluados para todos los tiempos de exposición a concentraciones superiores al 10% resultaron en porcentajes de viabilidad (16%-0%) significativamente inferiores con respecto al grupo control ($p < 0.05$); con excepción del tratamiento a una concentración de 15% y 15 min de exposición, no se encontraron espermatozoides viables en el resto de tratamientos ($< 5\%$) (Tabla 19) (Figura 20).

Tabla 19. Porcentaje de espermatozoides viables (promedio \pm desviación estándar) en la masa espermática de *Litopenaeus vannamei* evaluados con dicloruro de magnesio (MgCl₂).

Crioprotector (%)	Tiempo de Exposición (min)		
	15	30	60
Dicloruro de Mg (MgCl ₂)			
10	51.20 \pm 47.29 ^{ab}	35.60 \pm 37.80 ^{bc}	31.90 \pm 35.84 ^{bc}
15	16.00 \pm 34.89 ^{bc}	04.48 \pm 07.80 ^c	01.44 \pm 01.93 ^c
20	00.32 \pm 00.44 ^c	00.64 \pm 00.51 ^c	00.64 \pm 01.43 ^c
30	00.56 \pm 00.74 ^c	00.00 \pm 00.00 ^c	00.00 \pm 00.00 ^c
*CONTROL	96.00 \pm 02.84 ^a	93.92 \pm 03.66 ^a	96.00 \pm 02.33 ^a

Diferentes letras superindicadas en los resultados indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

**Se consideró como grupo control la evaluación de espermatozoides frescos empleando como medio diluyente la solución salina libre de calcio.*

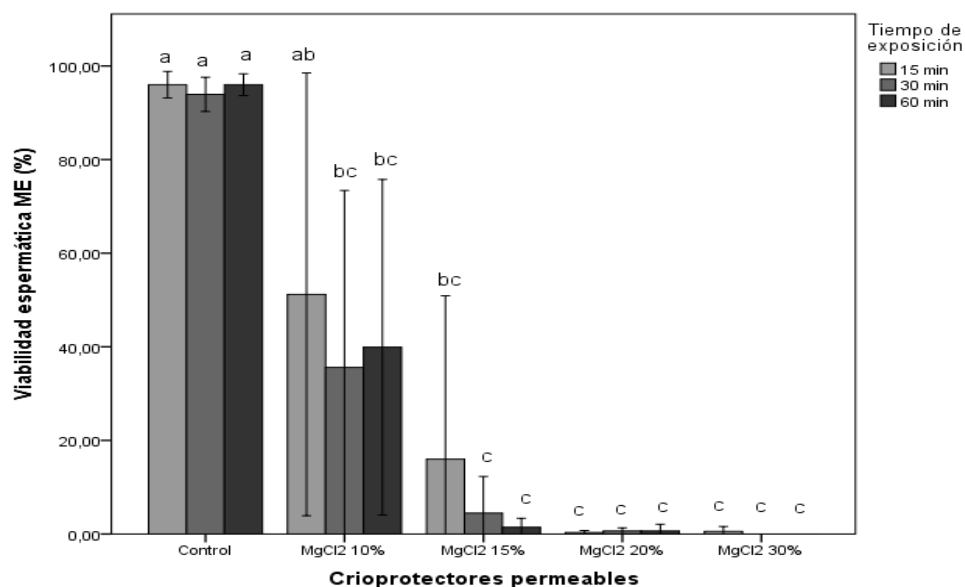


Figura 20. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de la citotoxicidad del dicloruro de magnesio sobre la masa espermática de *Litopenaeus vannamei* (promedio \pm DE) ($p < 0.05$).

D. 2-propanol

No se encontró espermatozoides viables ($< 1\%$) cuando los espermatozoides fueron evaluados en todos los tiempos de exposición a concentraciones iguales o superiores a 15% ($p < 0.05$).

El porcentaje de viabilidad más elevado resultó del tratamiento usando una concentración de 10% durante 15 min ($9.60 \pm 18.14\%$), no obstante, este resultado fue significativamente inferior con respecto al grupo control ($p < 0.05$). (Tabla 20) (Figura 21).

Tabla 20. Porcentaje de espermatozoides viables (promedio \pm desviación estándar) en la masa espermática de *Litopenaeus vannamei* evaluados con 2-propanol.

Crioprotector (%)	Tiempo de Exposición (min)		
	15	30	60
2-propanol			
10	9.60 ± 18.14^b	3.52 ± 04.15^b	0.08 ± 00.18^b
15	0.64 ± 01.22^b	0.24 ± 00.36^b	0.08 ± 00.18^b
20	0.08 ± 00.18^b	0.16 ± 00.22^b	0.00 ± 00.00^b
30	0.00 ± 00.00^b	0.00 ± 00.00^b	0.00 ± 00.00^b
*CONTROL	96.00 ± 02.84^a	93.92 ± 03.66^a	96.00 ± 02.33^a

Diferentes letras superindicadas en los resultados indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

*Se consideró como grupo control la evaluación de espermatozoides frescos empleando como medio diluyente la solución salina libre de calcio.

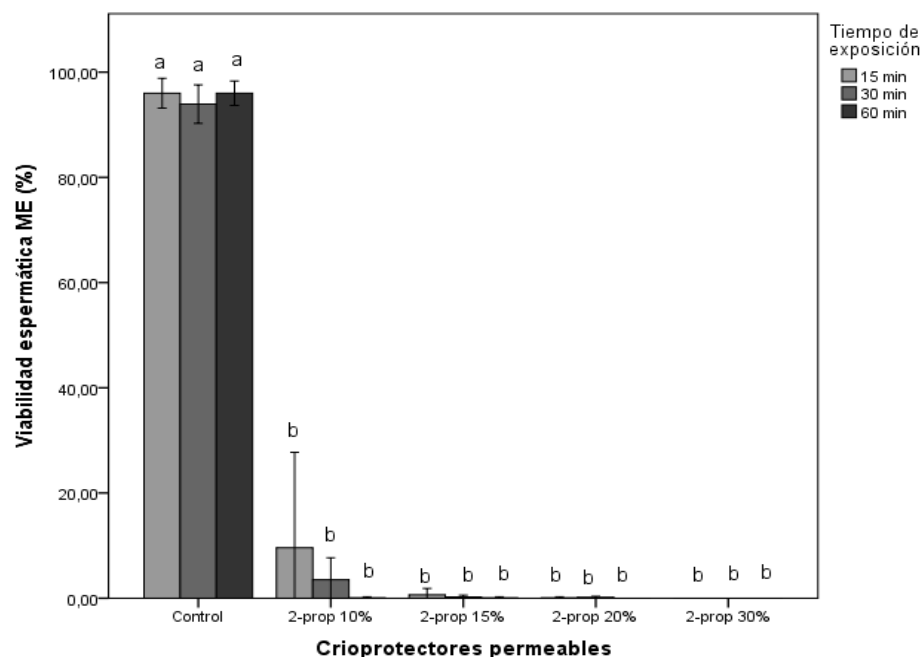


Figura 21. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de la citotoxicidad del 2-propanol sobre la masa espermática de *Litopenaeus vannamei* (promedio \pm DE) ($p < 0.05$).

Los resultados encontrados durante esta fase de la experimentación para la masa espermática (ME) permitieron seleccionar los siguientes tratamientos (ACPp x concentración x tiempo de exposición):

- ✓ MgCl_2 10%15min.
- ✓ DMSO 10%15min.
- ✓ MeOH 10% 30min.

No se seleccionaron tratamientos para el 2-propanol debido a que la citotoxicidad de este crioprotector no permite la sobrevivencia de espermatozoides viables para *Litopenaeus vannamei*.

6.3.3. Determinación del Crioprotector No Permeable (ACPnp)

Los resultados en cuanto a la citotoxicidad de la adición de los crioprotectores no permeables a las combinaciones determinadas por los resultados anteriores mostraron que la combinación de crioprotectores elevó los porcentajes de viabilidad en el tratamiento

con MgCl_2 y MeOH. Los tratamientos con manitol en combinación con MeOH y MgCl_2 resultaron en porcentajes de viabilidad espermática significativamente más bajos con respecto a la combinación con DMSO con un $79.12 \pm 06.45 \%$ ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de viabilidad cuando se usó leche descremada con DMSO, MgCl_2 y MeOH con respecto al control, mientras que el uso de polietilenglicol resultó en porcentajes de viabilidad similares en combinación con el DMSO y el MgCl_2 , siendo el tratamiento con MeOH significativamente inferior con respecto a los demás tratamientos ($p < 0.05$). Por otra parte, la sacarosa resultó en porcentajes de viabilidad significativamente similares al grupo control en combinación con DMSO y MeOH. Los resultados para los grupos control indican que no hubo un efecto significativo del tiempo de exposición sobre la viabilidad espermática. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 21 (Figura 22)

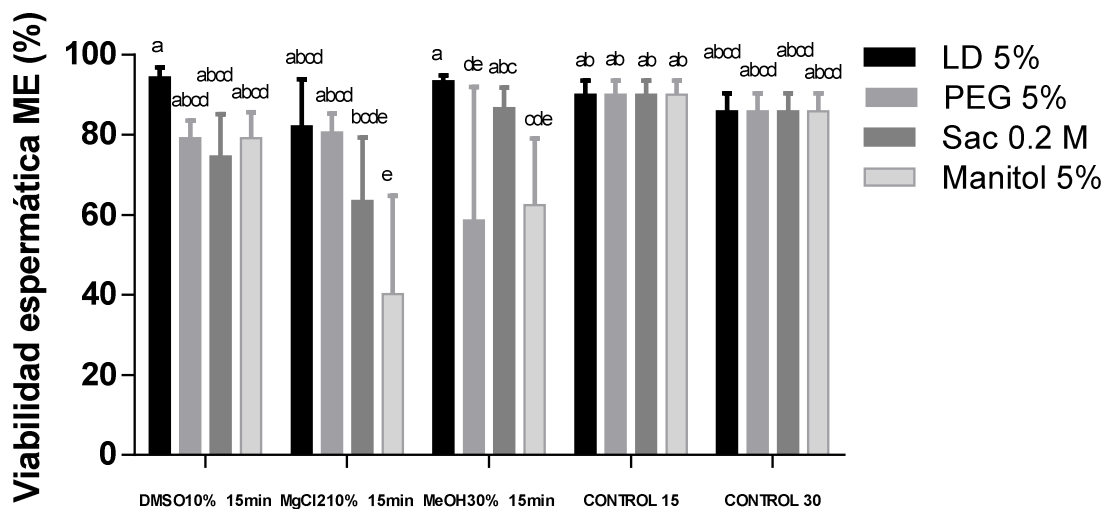
Tabla 21. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de la citotoxicidad de las soluciones crioprotectoras (ACPp +ACPnp) para las masas espermáticas de *Litopenaeus vannamei* (promedio \pm DE)

Solución crioprotectora		Citotoxicidad
		Viabilidad espermática (%)
LD 5%	DMSO 10% 15 min	94.40 \pm 02.38 ^a
	MgCl2 10% 15 min	82.16 \pm 11.73 ^{abcd}
	MeOH 10% 30min	93.36 \pm 01.51 ^a
PEG 5%	DMSO 10% 15 min	79.12 \pm 04.42 ^{abcd}
	MgCl2 10% 15min	80.56 \pm 04.75 ^{abcd}
	MeOH 10% 30min	58.64 \pm 33.31 ^{de}
Sacarosa 0.2M	DMSO 10% 15 min	74.64 \pm 10.52 ^{abcd}
	MgCl2 10% 15min	63.44 \pm 15.85 ^{bcd}
	MeOH 10% 30min	86.64 \pm 05.08 ^{abc}
Manitol 5%	DMSO 10% 15 min	79.12 \pm 06.45 ^{abcd}
	MgCl2 10% 15min	40.24 \pm 24.59 ^e
	MeOH 10% 30min	62.48 \pm 16.56 ^{cde}
*CONTROL 15		90.00 \pm 03.51 ^{ab}
**CONTROL 30		85.92 \pm 04.36 ^{abcd}

Diferentes letras superindicadas en los resultados indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

* * El grupo control 15 consistió en espermátóforos frescos ($n=5$) en solución salina libre de calcio (SS Ca-free) durante un tiempo de exposición de 15 minutos.

** El grupo control 30 consistió en espermátóforos frescos ($n=10$) en solución salina libre de calcio (SS Ca-free) durante un tiempo de exposición de 30 minutos.



Crioprotectores permeables

Figura 22. Porcentajes de viabilidad espermática de la evaluación de citotoxicidad de las soluciones crioprotectoras (ACPp + ACPnp) para las masas espermáticas de *Litopenaeus vannamei* (promedio \pm DE).

Control: Solución salina libre de calcio (SS Ca-free). Los datos son presentados como barras (media \pm DE, n = 70 espermatozoides). Diferentes letras en la parte superior de las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Los resultados encontrados durante esta fase de la experimentación para la Masa espermática (ME) permitieron seleccionar los siguientes tratamientos:

- ✓ MgCl₂ 10%15min + leche descremada 5%.
- ✓ DMSO 10%15min + leche descremada 5%.
- ✓ MeOH 10% 30min + leche descremada 5%.

6.3.3.1. Evaluación Post-Vitrificación

Los resultados para la masa espermática (ME) (Tabla 22) muestran que a pesar de que las combinaciones conformadas por agentes crioprotectores permeables y no permeables no son tóxicas para las células espermáticas, únicamente la combinación de leche descremada y MgCl₂ protege efectivamente los espermatozoides durante el proceso de vitrificación con un porcentaje de viabilidad de $79.68 \pm 10.09\%$ significativamente más

elevado con respecto a los demás tratamientos, incluido el grupo control ($p < 0.05$) (Figura 23).

Tabla 22. Porcentajes de viabilidad espermática post-vitrificación de las soluciones crioprotectoras (ACPp + ACPnp) para las masas espermáticas de *Litopenaeus vannamei* (promedio \pm DE).

Solución crioprotectora	Vitrificación	
	Viabilidad espermática (%)	
Leche descremada 5%		
MgCl ₂ 10% 15min		79.68 \pm 10.09
DMSO 10% 15min		01.60 \pm 01.60
MeOH 10% 30min		00.88 \pm 00.33
*CONTROL		00.40 \pm 00.00

*El grupo control consistió en espermatozoides congelados en solución salina libre de calcio (SS Ca-free) sin crioprotectores. MgCl₂: dicloruro de magnesio, DMSO: dimetilsulfóxido, MeOH: metanol ($p < 0.05$).

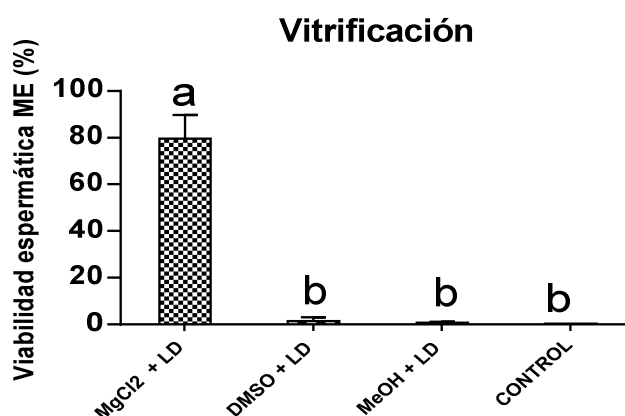


Figura 23. Viabilidad espermática en la masa espermática de *Litopenaeus vannamei* después de la vitrificación con soluciones crioprotectoras (ACPp + ACPnp).

Control: espermatozoides congelados en solución salina libre de calcio (SS Ca-free). Los datos son presentados como barras (media \pm DE, $n = 20$ espermatozoides). Diferentes letras en la parte superior de las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

A pesar del porcentaje de viabilidad encontrado para la masa espermática, se continuó con la evaluación de las soluciones complejas (yema de huevo, *Aloe vera*, SFB y Suero de ternera) con el método de vitrificación.

6.3.4. Determinación de la Solución Compleja (SC) Post-Vitrificación

Los resultados de la viabilidad espermática post-vitrificación de las soluciones conformadas por crioprotectores permeables, crioprotectores no permeables y soluciones

complejas (SC) mostraron promedios de viabilidad espermática extremos para la masa espermática (ME) de *Litopenaeus vannamei*. Las soluciones conformadas por $MgCl_2$ y leche descremada con cualquiera de las cuatro soluciones complejas resultaron en porcentajes de viabilidad superiores al 50 %, alcanzado un máximo de 72.24 ± 17.50 % de espermatozoides viables con el extracto de *Aloe vera*, no obstante, no existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la viabilidad espermática resultante del tratamiento con *Aloe vera* y el tratamiento con yema de huevo (70.24 ± 10.79 %).

Las combinaciones empleando el MeOH como crioprotector permeable resultaron en los porcentajes de viabilidad significativamente más bajos ($< 7\%$), alcanzado su más alto porcentaje de viabilidad en combinación con la yema de huevo (06.72 ± 04.61 %) ($p < 0.05$). Las soluciones conformadas por DMSO resultaron en bajos porcentajes de viabilidad ($< 20\%$), alcanzado su valor más bajo con el suero de ternera (01.36 ± 00.83 %). El grupo control resultó en un promedio de viabilidad espermática < 7 %, excepto por el tratamiento con yema de huevo el cual resultó en 13.68 ± 08.78 % de células viables, siendo significativamente diferente del resto de soluciones complejas ($p < 0.05$). Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 23 (Figura 24)

Tabla 23. Porcentajes de viabilidad espermática post vitrificación de las soluciones crioprotectoras (ACPP + ACPnp + SC) para los espermátóforos de *Litopenaeus vannamei* (promedio \pm DE).

Solución crioprotectora		Post Vitrificación
		Viabilidad espermática (%)
Yema de huevo 10%	MgCl ₂ 10% 15min + LD 5%	70.24 \pm 10.79
	DMSO 10% 15 min + LD 5%	18.24 \pm 10.06
	MeOH 10% 30min + LD 5%	06.72 \pm 04.61
Aloe vera 10%	MgCl ₂ 10% 15min + LD 5%	72.24 \pm 17.50
	DMSO 10% 15 min + LD 5%	06.40 \pm 01.81
	MeOH 10% 30min + LD 5%	01.68 \pm 01.56
Suero fetal bovino 10%	MgCl ₂ 10%15 min + LD 5%	64.88 \pm 09.24
	DMSO 10% 15 min + LD 5%	12.72 \pm 06.33
	MeOH 10% 30min + LD 5%	03.44 \pm 01.95
Suero de ternera 10%	MgCl ₂ 10%15 min + LD 5%	51.12 \pm 12.42
	DMSO 10% 15 min + LD 5%	01.36 \pm 00.83
	MeOH 10% 30min + LD 5%	04.16 \pm 01.25
*CONTROL	Yema de huevo 10%	13.68 \pm 08.78
	Aloe vera 10%	01.36 \pm 00.61
	Suero fetal bovino 10%	03.20 \pm 02.17
	Suero de ternera 10%	06.00 \pm 03.86

* El grupo control consistió en espermia congelada en solución salina libre de calcio (SS Ca-free) + soluciones complejas. MgCl₂: dicloruro de magnesio, DMSO: dimetilsulfóxido, MeOH: metanol ($p < 0.05$).

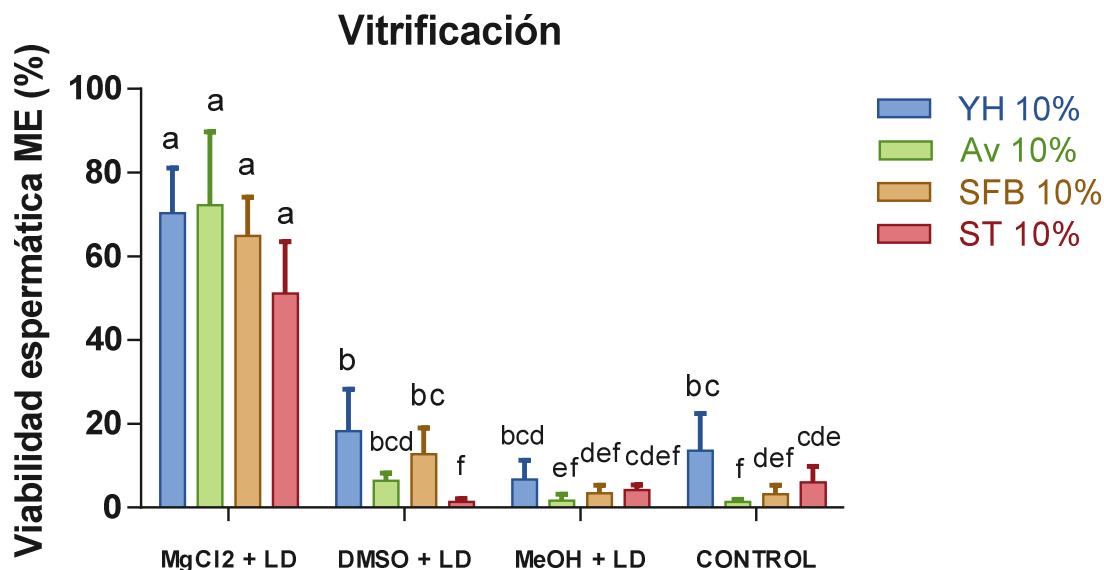


Figura 24. Viabilidad espermática en la Masa espermática de *Litopenaeus vannamei* después de la vitrificación con soluciones crioprotectoras (ACPp + ACPnp +SC).

Control: espermia congelada en soluciones complejas (SC). Los datos son presentados como barras (media \pm DE, $n = 80$ espermátóforos). Diferentes letras en la parte superior de las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Debido a que el tratamiento con MgCl₂ 10% 15min+ leche descremada 5% proporciono un promedio de viabilidad espermática superior al 70%, sin la necesidad de la adición de una solución compleja, mientras que los tratamientos con yema de huevo y *Aloe vera* también resultaron en porcentajes de viabilidad superior al 70%, para determinar la solución crioprotectora óptima para la criopreservación de la Masa espermática (ME) se realizaron 5 réplicas adicionales de los tratamientos con los mejores porcentajes de sobrevivencia espermática, obteniéndose los siguientes resultados:

T1: MgCl₂ 10% 15min+ leche descremada 5%. (VE*=72.24 \pm 17.50 %)

T2: *Aloe vera* 10% + MgCl₂ 10% 15min+ leche descremada 5%. (VE*=78.52 \pm 13.74 %)

* VE: Viabilidad espermática.

Los tratamientos resultaron en porcentajes de viabilidad espermática superiores al 70% y no se encontraron diferencias significativas entre estos ($p < 0.05$). Finalmente se consideró

el tratamiento 2 como la solución crioprotectora óptima ya que el empleo de *Aloe vera* como solución compleja brinda propiedades antisépticas.

6.4. Inseminación artificial (IA) con Esperma Criopreservada

6.4.1. Conteo Volumétrico de Embriones

Durante la evaluación del desove se observaron los siguientes eventos:

# Tanque de desove	82	83	84
Solución Crioprotectora	<i>Aloe vera</i> 10% leche descremada 5% y MgCl ₂ 10% en SS Ca-free.	Yema de huevo 10% Sacarosa 0.2 M y MgCl ₂ 10% en SS Ca-free.	SFB 10% Sacarosa 0.2 M y MgCl ₂ 10% en SS Ca-free.
Desove	<i>Desove total</i>	<i>Aborto (Fig. 3.3) y desove parcial (Fig. 3.4)</i>	<i>Tiempo adicional de 30 min. Desove total.</i>

Los resultados se resumen en la Tabla 24.

Tabla 24. Número de embriones por tratamiento durante la inseminación artificial (IA).

Tanque de desove N°	Densidad (embriones/ml)	Número de embriones
82	33	49,5 x 10 ⁴
83	15	22,5 x 10 ⁴
84	29	43,5 x 10 ⁴
*CONTROL	38	57 x 10 ⁴

*Únicamente desovó una hembra en el tanque de desove de las tres que fueron consideradas para el grupo control.

La cantidad de huevos embrionados en el tanque 82 del tratamiento con *Aloe vera* (33 huevos/ml) fue el más cercano al grupo control (38 huevos /ml). El tanque de desove 83 del tratamiento con yema de huevo obtuvo menos de la mitad de cantidad de embriones que el grupo control, mientras que el empleo de SFB estuvo cercano al tratamiento con *Aloe vera* (29 huevos /ml). No se observaron malformaciones en los embriones.

6.4.2. Conteo Volumétrico de Nauplios

Durante la evaluación de la eclosión se observaron los siguientes eventos:

# Tanque de eclosión	82	83	84
Solución Crioprotectora	<i>Aloe vera</i> 10% leche descremada 5% y MgCl ₂ 10% en SS Ca-free.	<i>Yema de huevo</i> 10% Sacarosa 0.2 M y MgCl ₂ 15% en SS Ca-free.	<i>SFB</i> 10% Sacarosa 0.2 M y MgCl ₂ 15% en SS Ca-free.
Eclosión	<i>Si hubo</i>	<i>No hubo</i>	<i>Si hubo.</i>

Los resultados se resumen en la Tabla 25.

Tabla 25. Numero de nauplios eclosionados por tratamiento durante la inseminación artificial (IA).

Tanque de eclosión N°	Densidad (nauplios/mL)	Numero de nauplios
82	2	30 x 10 ³
83	-	-
84	4	60 x 10 ³
*CONTROL	8	160 x 10 ³

La cantidad de nauplios eclosionados en el tanque número 82 del tratamiento con *Aloe vera* (2 nauplios /ml) fue la cuarta parte del grupo control (8 nauplios /ml), mientras que en el tanque número 83 del tratamiento con yema de huevo no hubo eclosión de nauplios. El tanque número 84 del tratamiento con SFB (4 nauplios/ml) obtuvo el doble de nauplios que el tratamiento con *Aloe vera*. Dentro de los estándares de la empresa Marinasol S.A.C. la cantidad normal de nauplios eclosionadas es de 4 nauplios/ml. No se observaron malformaciones durante el proceso de eclosión.

6.4.3. Porcentaje de Eclosión de Nauplios

Los resultados se resumen en la Tabla 26.

Tabla 26. Porcentajes de eclosión por tratamiento durante la inseminación artificial (IA).

Tanque de eclosión N°	Porcentaje de Eclosión (%)
82	6,06
83	0,00
84	13,79
*CONTROL	28,07

El porcentaje de eclosión alcanzado por el grupo control fue de 28%, mientras que el tratamiento con SFB (suero fetal bovino) alcanzó un porcentaje de eclosión de 13.8%. El porcentaje de eclosión con el tratamiento con *Aloe vera* fue de 6%, siendo este el valor más bajo encontrado.

7. DISCUSIÓN

Los resultados encontrados para los machos sexualmente maduros de *Litopenaeus vannamei* con un peso corporal promedio de 28 ± 4.67 gr muestran que no existen diferencias entre los pesos del espermatóforo derecho e izquierdo dentro de cada individuo, esta característica fue reportada también para *Penaeus monodon* por Vuthiphandchai et al. (2007) y para *Penaeus merguensis* por Memon et al. (2012). El peso promedio para los espermatóforos encontrados durante esta evaluación fue de 0.0275 ± 0.0092 gr (n=42), estos valores están en concordancia con los reportados por Ceballos et al. (2003) quienes evaluaron la calidad espermática en relación a la edad y peso de machos de *Litopenaeus vannamei* encontrando que los machos de 8 meses de edad presentan en promedio un peso corporal (W gr) de 24.7 ± 0.4 gr con un peso promedio de espermatóforos de 0.0158 ± 0.0015 gr; Uberti (2012) empleo machos de *Litopenaeus vannamei* con un peso corporal de 42.6 ± 3.39 gr y un peso promedio de los espermatóforos de 0.033 ± 0.0034 gr para la evaluación de la integridad de membrana de esperma criopreservada; Chao et al. (2009) criopreservaron espermatóforos de *L. vannamei* con un peso corporal promedio de 27.86 ± 4.64 gr, sin embargo, no reportaron el peso de los espermatóforos evaluados. Con respecto a las especies filogenéticamente cercanas, el peso de los espermatóforos reportados en este estudio es menor a los reportados por Memon et al. (2012) para *Penaeus merguensis* (W gr = 24.2 ± 3.84 gr) con un peso promedio de espermatóforo de 0.048-0.092 gr; Vuthiphandchai et al. (2007) para los espermatóforos de *Penaeus monodon* (W gr = 90.5 ± 4.9 gr.) con un peso promedio de espermatóforo de 0.093 ± 0.008 gr y Bambozzi et al. (2014) quienes reportaron un valor de 0.14 ± 0.03 gr para el peso promedio de los espermatóforos de *Litopenaeus schmitii* (W gr = 22.8 ± 3.87 gr). Estos resultados indicarían que estas especies presentan un mayor crecimiento de los espermatóforos con respecto al peso corporal en comparación con *Litopenaeus vannamei*.

La determinación de la estructura a criopreservar es un punto crucial para la formulación de protocolos de criopreservación, en el caso de los langostinos, diversos estudios se enfocan en la criopreservación del espermátóforo, mientras otro grupo considerable desarrolla protocolos en base a la masa espermática. Investigaciones con respecto a la comparación de la criopreservación de espermátóforo, masa espermática y células en suspensión afirman que la masa espermática soporta mejor los tratamientos de congelación (Salazar et al., 2008; Lezcano et al., 2004). Una posible explicación se basa en la penetrancia de la solución de crioprotección en las células, ya que en la suspensión espermática hay una mayor exposición que puede ser muy tóxica para las células, a diferencia de la masa espermática que posee una capa gelatinosa de protección, en cambio en estructuras como los espermátóforos, el ingreso a las células puede ser poco homogéneo debido a que están demasiado protegidas (Salazar et al., 2008; Lezcano et al., 2004; Bambozzi, 2013). El presente estudio no registra diferencias significativas en la viabilidad espermática obtenida entre el grupo de espermátóforo y de masa espermática cuando son evaluados con los diferentes tratamientos de criopreservación.

Las características físicas del espermátóforo y la masa espermática posterior al descongelamiento variaron en cuanto a volumen y adhesividad, esto principalmente debido a la sobrehidratación producida durante el descongelamiento, la cual genera el aumento del volumen de las estructuras reproductivas criopreservadas y la pérdida de adhesividad. Estos eventos también han sido reportados para la misma especie por Lezcano (2001) y en la criopreservación de espermátóforos de *Macrobrachium rosenbergii* por Chow et al. (1985).

La disminución de la adhesividad afecta la fertilidad durante el proceso de inseminación artificial, ya que el éxito de la fecundación radica en que la masa espermática permanezca adherida al telico de la hembra hasta el momento del desove (Arce et al., 2000). Como

alternativa a esta problemática se ha propuesto el uso de adhesivos artificiales de fraguado rápido (cianocrilato) en la inseminación artificial de *Macrobrachium rosenbergii* (Damrongphol & Akarasanon 2008), esta técnica también podría ser evaluada para *Litopenaeus vannamei*.

Las pruebas realizadas para determinar el medio de extensión más adecuado para la mantención de la viabilidad espermática del espermatóforo y la masa espermática de *L. vannamei* resultaron en que la solución salina libre de calcio (SS Ca-free) mantiene porcentajes de sobrevivencia espermática superiores al 75% ($p < 0.05$) después de 12 horas de incubación a temperatura ambiente, para ambas estructuras reproductivas. En contraste, la solución buffer fosfato y la Solución de Ringer no sobrepasaron el 30% de sobrevivencia, observándose una gran cantidad de células espermáticas evertidas (ver **Tabla 8** y **Tabla 16**). Esto podría deberse a la baja osmolaridad de los dos últimos medios, ya que como sugiere Lezcano (2001), al ser *L. vannamei* una especie marina, el medio natural que habita se compone de una gran cantidad de solutos lo que conlleva a que su metabolismo celular este adecuado a una alta osmolaridad, en consecuencia, cuando su esperma es aislada en soluciones hiposmóticas, las células tienden a evertirse mostrando un evento similar a la reacción acrosómica.

Los resultados de esta evaluación mostraron que la SS Ca-free es la única solución de extensión idónea para la formulación de soluciones crioprotectoras para los espermatozoides de *L. vannamei*, este resultado concuerda con lo reportado por Chomphuthawach (2015) para *Penaeus monodon*, sin embargo, en dicha investigación el aceite mineral también obtuvo porcentajes de viabilidad significativamente elevados, aun después de 120 horas de almacenamiento; Igualmente, Nimrat et al. (2006) concluyeron, después de una evaluación de 35 días de almacenamiento en frío, que el aceite mineral + 0.1% antibiótico fue el mejor medio diluyente para la mantención de la viabilidad

espermática de *Litopenaeus vannamei* (69.5%), sin embargo, en este último experimento no se evaluó la SS Ca-free. Los altos porcentajes de sobrevivencia espermática con el uso de aceite mineral para almacenamiento en corto plazo podría deberse a que previene la deshidratación de las células (Steponkus et al., 1990). No obstante, el aceite mineral no ha sido empleado en la formulación de soluciones crioprotectoras, probablemente debido a que su alta viscosidad no permite el proceso de mezcla con los agentes crioprotectores.

Una gran cantidad de investigaciones emplearon la Solución Salina libre de calcio (SS Ca-free) como medio diluyente para la preservación de la esperma de crustáceos (Fatihah et al., 2016; Castelo-Branco et al., 2015; Chomphuthawach, 2015; Morales-Ueno et al., 2013; Memon et al., 2012; Bambozzi, 2013; Chao et al., 2009; Vuthiphandchai et al., 2007; Bart et al., 2006), asimismo, otro grupo de investigadores emplearon el agua de mar filtrada y esterilizada (SSW) como medio diluyente (Uberti et al., 2014; Yang et al., 2013; Salazar et al., 2008; Dong et al., 2004; Lezcano et al., 2004; Diwan & Joseph 2000; Gwo & Lin 1998; Ke & Cai 1996). En contraste, Bray & Lawrence (1998) ensayaron el almacenamiento de espermátóforos y tejido gonadal de *L. vannamei* hasta 36 h comparando la SS Ca-free y la SSW como medios diluyentes, encontrando que el empleo de estas soluciones no afectaba el conteo espermático ni el porcentaje de esperma anormal. La problemática con emplear el agua de mar reside en la variabilidad en la composición de la misma, la cual generaría inestabilidad en la solución crioprotectora, en consecuencia su empleo en la formulación de protocolos de criopreservación no sería recomendable.

De acuerdo con distintos investigadores, la solución salina libre de calcio es principalmente empleada en la preservación de esperma de crustáceos debido a que la ausencia de calcio inhibe la reacción acrosómica (Chomphuthawach, 2015; Cabrita et al., 2008; Gwo et al., 2000), sin embargo, este no sería el verdadero fundamento de su éxito,

ya que numerosas investigaciones emplearon el agua de mar como medio diluyente o grupo control (Uberti et al., 2014; Yang et al., 2013; Salazar et al., 2008; Dong et al., 2004; Lezcano et al., 2004; Diwan & Joshep 2000; Gwo & Lin 1998; Ke & Cai 1996), sin reportar células con reacción acrosómica, incluso considerando al contenido de calcio presente en el agua de mar. En el caso específico de *Litopenaeus vannamei* esta hipótesis pierde aún más fundamento, ya que las evaluaciones de la reacción acrosómica mediante la técnica de agua de desove (solución de activadores expulsados durante el desove y agua de mar) y la inducción con el ionoforo de calcio A23187 en agua de mar resultaron en bajos valores de reactividad (Wang et al., 1995; Alfaro et al., 2007; Alfaro et al., 2003; Lezcano, 2001), lo que se sustentaría en que la capacitación final del espermatozoide suceda sobre telico de la hembra (Alfaro, 2010b; Aungsuchawan et al., 2011; Alfaro-Montoya et al., 2016), estando los espermatozoides inmaduros cuando son extraídos directamente de los espermatóforos. En consecuencia, el empleo de soluciones dilutoras compuestas por calcio sería factible en esta especie.

De acuerdo con Pongtippatee et al. (2007), la reacción acrosómica en la esperma de *Penaeus monodon* ocurre durante el desove y está compuesta por dos fases: la exocitosis acrosomal y la formación del proceso acrosómico, estos eventos permiten el ingreso del ADN espermático al huevo. La interacción entre el huevo y la esperma capacitada activa los canales de Ca^{+2} del espermatozoide permitiendo su ingreso, el incremento de calcio intracelular activa las enzimas hidrolíticas del acrosoma mediante una cascada de reacciones bioquímicas la cual permite la exocitosis del acrosoma (Abou-haila & Tulsiani, 2009).

El uso de agentes antioxidantes en la criopreservación complementa la crioprotección frente a daños por estrés oxidativo, favoreciendo así una mayor sobrevivencia espermática. Rodríguez & Nivia (2017) afirman que únicamente la adición de

antioxidantes no enzimáticos (cisteína, propóleo, ácido L-ascórbico, lisina y carnitina) favorecen la fertilidad post-descongelamiento en espermatozoides de peces, mientras que, los antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, peróxidasa y catalasa) afectan negativamente la fertilidad.

Otras investigaciones han demostrado que la vitamina C (ácido L-ascórbico) mejora la actividad inmunitaria, el crecimiento y la tolerancia al estrés de *L. vannamei* en sistemas de cultivo (Qiao et al., 2011; Niu et al., 2009). En el aspecto reproductivo, se ha demostrado que la vitamina C es un factor clave que aumenta la calidad espermática, mejora la maduración ovárica y la fertilidad en *Litopenaeus vannamei* (Quiao et al., 2011; Alfaro-Montoya, 2010). A la fecha, esta vitamina cuenta con reportes de su empleo como antioxidante en la criopreservación de especies acuícolas (Liu et al., 2014; Mirzoyan et al., 2006).

La vitamina C actúa como antioxidante en células y tejidos de dos maneras: mediante la reacción con los radicales superóxido acuoso, e indirectamente mediante la restauración de las propiedades antioxidantes de la vitamina E, controlando así la peroxidación lipídica de las membranas celulares (Bendich et al., 1986).

Los gráficos de viabilidad espermática para las evaluaciones de crioprotectores permeables en la masa espermática y el espermatozoides muestran una tendencia a la disminución de la viabilidad con el aumento de la concentración y el tiempo de exposición, a concentraciones superiores al 20% y tiempos superiores a los 30 min, estos son muy citotóxicos para la espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* ($p < 0.05$), similares resultados fueron previamente reportados (Chao et al., 2009; Castelo-Branco et al., 2015; Fatihah et al., 2016).

Dentro de los crioprotectores empleados en la presente investigación, el $MgCl_2$ es una sal

ampliamente utilizada protocolos de extracción de ADN (Das & Dash, 2015), asimismo, se ha reportado su empleo como componente de soluciones dilutoras para el congelamiento de esperma en especies acuícolas (Yavaş et al., 2014; Babiak et al., 1997; Diwan & Kandasami, 1997; Zhang et al., 2003) y como crioprotector permeable en protocolos de criopreservación en peces (Muchlisin, 2005) y langostinos peneidos (Memon et al., 2012). También, se ha reportado su empleo como agente permeabilizante del DMSO en embriones de peces (Rahman et al., 2011).

A pesar de que el metanol es considerado citotóxico a temperatura ambiente (Arun & Subramoniam, 1997), éste ha sido utilizado como solución de crioprotección de manera exitosa en la preservación de la esperma de *L. vannamei* (Vuthiphandchai et al., 2007; Lezcano et al., 2004) sobre otros reactivos como DMSO, etilenglicol, propilenglicol o formamida. Así también, se ha reportado una alta viabilidad espermática post- vitrificación de la masa espermática de *L. vannamei* utilizando el metanol al 10% como crioprotector permeable (Castelo-Branco et al., 2015). Además, Salazar et al. (2008) demostró que no existieron diferencias significativas cuando se comparó su efecto con el DMSO y glicerol en la masa espermática de *L. vannamei*. Sin embargo, estudios posteriores demostraron una menor capacidad de preservación espermática del metanol en esperma de langostinos (Valentina et al., 2016; Memon et al., 2012). La capacidad crioprotectora del metanol frente al congelamiento se atribuye a su capacidad como solvente que le permite disolver algunos lípidos de la membrana aumentando así su permeabilidad (Jamur & Oliver, 2010) y debido a su capacidad de deshidratación evita la formación de cristales, protegiendo de esta manera a las células (Lewis et al., 1994).

Antagónicamente a lo reportado por Castelo-Branco et al. (2015) para *L. vannamei*, los resultados obtenidos en la presente investigación descartaron el empleo del metanol como crioprotector permeable debido a su alta citotoxicidad, siendo seleccionado el

MgCl₂ como crioprotector permeable, resultados similares fueron reportado por Memon et al. (2012). El mecanismo de acción del MgCl₂ en la presente formulación podría deberse a un incremento de la permeabilidad celular que permita la penetración de moléculas protectoras presentes en las soluciones complejas.

Los resultados obtenidos de la evaluación de los 4 crioprotectores permeables indican que para ambas estructuras reproductivas, el 2-propanol no permite la viabilidad espermática, siendo este altamente citotóxico ($p < 0.05$) (ver Tabla 12 y Tabla 20).

La evaluación de la combinación de crioprotectores no permeables con los tres crioprotectores permeables seleccionados (MeOH, MgCl₂ y DMSO) resultó para el espermátforo en que las combinaciones con manitol y sacarosa disminuyeron la viabilidad significativamente ($p < 0.05$) (ver Figura 14) reportándose el mayor porcentaje ($VE = 83.84 \pm 05.38\%$) para la combinación de MgCl₂ y leche descremada ($p < 0.05$) (ver Tabla 13); sin embargo, para la masa espermática, todas las combinaciones resultaron en porcentajes de viabilidad elevados, demostrando así que estas combinaciones disminuían la citotoxicidad (ver Figura 22) reportándose un mayor porcentaje ($VE = 94.40 \pm 02.38\%$) para la combinación de DMSO y leche descremada ($p < 0.05$) (ver Tabla 21). Además, la combinación de leche descremada con los crioprotectores permeables (MgCl₂, DMSO y MeOH) disminuyó la toxicidad espermática de las soluciones tanto para el espermátforo como para la masa espermática de *Litopenaeus vannamei* ($p < 0.05$).

Las moléculas de azúcar (sacarosa) han sido ampliamente empleados como crioprotectores no permeables en la criopreservación, su mecanismo de acción consiste en la interacción con la bicapa lipídica durante el congelamiento manteniendo la integridad de la membrana plasmática frente a la deshidratación (Tsai et al., 2017). Para la criopreservación de espermatozoides de langostinos diversos autores han empleado de manera exitosa la sacarosa dentro de sus soluciones (Lezcano et al., 2004; Uberti et al., 2014;

Salazar et al., 2008; Memon et al., 2012; Vuthiphandchai et al., 2005), nuestros resultados por otra parte, reportan mayores porcentajes de viabilidad espermática con el empleo de la leche descremada, la cual no ha sido evaluada anteriormente en crustáceos.

La leche descremada contiene poco menos del 0.2 % de la grasa presente en la leche entera y es reconocida por estabilizar la membrana plasmática del espermatozoide. Filho et al., 2009, evaluaron el efecto de una solución de extensión basada en la leche descremada y yema de huevo en semen equino encontrando que esta combinación compensa la actividad antioxidante no enzimática durante la criopreservación. Por otra parte, Abinawanto et al. (2016) reportaron que la combinación de 20% de leche descremada y metanol 5% fue óptima para la criopreservación de espermatozoides de *Barbonymus gonionotus* "lengüeta de Java".

El componente proteico de la leche descremada posee actividad antioxidante la cual es responsable de la crioprotección extracelular durante la criopreservación (Abinawanto et al. 2016; Jiménez-Guzmán et al. 2002).

Por otra parte, si bien las evaluaciones con el crioprotector no permeable leche descremada resultaron en soluciones de baja citotoxicidad para ambas estructuras reproductivas ($p < 0.05$) (ver Tabla 13 y Tabla 21), la evaluación post vitrificación demostró que estas combinaciones no fueron crioprotectoras para ninguna de las estructuras reproductivas (ver Tabla 14 y Tabla 22), con excepción de la combinación de $MgCl_2$ y leche descremada para la masa espermática ($VE = 79.68\%$, $p < 0.05$) (ver Figura 23).

Con respecto a las soluciones complejas, la yema de huevo ha sido muy aplicada en la criopreservación, la composición de esta, consistente en lípidos, proteínas y lipoproteínas, permite la formación de agregados de una consistencia gelatinosa a temperaturas por debajo de $0^{\circ}C$, lo cual evita la formación de cristales en las primeras etapas del

congelamiento (Au et al., 2015). Esta solución compleja ha sido empleada en la criopreservación de semen de gacela con buenos resultados al utilizar yema de huevo al 5% en adición del glicerol (Garde et al., 2008). En otro estudio, en el cual se evaluaron diferentes crioprotectores naturales para la preservación de esperma de pez gato africano (*Clarias gariepinus*), se determinó que el empleo de yema de huevo al 10% mostró una alta tasa de fertilización y de eclosión luego de 45 días de conservación en nitrógeno líquido (Muchlisin et al., 2005). Además, en el pez barbo plateado (*Barbonymus gonionotus*) se determinó que la conservación del esperma a -34°C por 24 horas resultó con altos valores de viabilidad y movilidad del esperma luego de su descongelamiento, cuando se utilizó la yema de huevo al 15% (Abinawanto & Lestari, 2013). Para *Litopenaeus vannamei* se reporta el uso de yema de huevo en el protocolo reportado por Salazar et al. (2008), sin embargo, su uso no sería recomendable ya que podría acarrear problemas de bioseguridad (María et al. 2006).

Los resultados de las soluciones finales frente a la técnica de vitrificación para el espermátforo mostraron que únicamente la combinación de extracto de *Aloe vera*, $MgCl_2$ y Leche descremada resultaron en porcentaje de viabilidad significativamente superiores (VE= $85.12 \pm 04.69\%$, $p < 0.05$) (ver Tabla 15) con respecto a los demás tratamientos (ver Figura 16).

Asimismo, los resultados de las soluciones finales frente a la técnica de vitrificación para la masa espermática mostraron que las combinaciones de $MgCl_2$, leche descremada y cualquiera de las soluciones complejas resultaron con porcentaje de viabilidad significativamente altos, siendo la solución con *Aloe vera* la que obtuvo el mayor resultado (VE= $72.24 \pm 17.50\%$, $p < 0.05$) (ver Tabla 23) con respecto a los demás tratamientos (ver Figura 24). De las evaluaciones realizadas para el grupo control, se obtuvo que las

soluciones complejas por sí mismas no proveen efecto crioprotector algunos sobre las células espermáticas de *Litopenaeus vannamei* ($p < 0.05$).

Finalmente, en la evaluación para la masa espermática con $MgCl_2$, leche descremada con y sin *Aloe vera* no se encontraron diferencias significativas entre estos tratamientos ($VE = 78.52 \pm 13.74 \%$ y $VE = 72.24 \pm 17.50\%$, respectivamente) ($p < 0.05$) (ver Anexo 11.1.5), indicando que, la incorporación de la solución compleja *Aloe vera* no afecta la viabilidad espermática para la masa espermática, mientras que para el espermátóforo este factor es determinante.

El empleo exitoso del extracto de *Aloe vera* como crioprotector ha sido descrito en semen ovino y porcino (Ramírez et al., 2006; Souza et al., 2016; Yanza & Humberto, 2017), en el campo de la acuicultura, la aplicación del extracto de *Aloe vera* ha sido estudiado exitosamente en la criopreservación de esperma de *Oreochromis niloticus* (Yong et al., 2017), mientras que, en *Colossoma macropomum* se obtuvieron resultados adversos (Melo-Maciel et al., 2015). El mecanismo de crioprotección probablemente esté relacionado con el contenido de azúcares y sustancias biológicamente activas (vitaminas, minerales, enzimas, lípidos, compuestos orgánicos, aminoácidos fitoquímicos antioxidantes) que pueden actuar como crioprotectores convencionales (Yong et al., 2017; Domínguez et al., 2012). Adicionalmente, el empleo del *Aloe vera* como componente de una solución crioprotectora posee varias ventajas como la antisepsia a patógenos de origen animal y el efecto protector ante infecciones por su contenido de antraquinonas (Souza et al., 2016). Las evaluaciones realizadas en la presente investigación permiten afirmar que el *Aloe vera* no produce artefactos durante el conteo celular, ventaja importante con respecto a la yema de huevo, considerando que la esperma de *L. vannamei* suele confundirse con los artefactos generados por esta última.

A la fecha, no se han reportado ensayos de fertilidad de esperma criopreservada con extracto de *Aloe vera*, los resultados obtenidos en el presente trabajo indicaron una alta viabilidad para esta solución, sin embargo, un alto índice de sobrevivencia no necesariamente es indicador de una alta fertilidad.

Las pruebas de Inseminación artificial (IA) efectuadas en la presente investigación resultaron en desoves parciales y totales, el desove puede verse interrumpido por factores ambientales o de desarrollo reproductivo del individuo, no obstante, la cantidad de embriones obtenidos en el desove (50×10^4 en promedio) (ver Tabla 24) y la cantidad de nauplios eclosionados (45×10^3 en promedio) (ver Tabla 25) concuerdan con los datos publicados por Gutiérrez et al. (2014), sin embargo, estos resultados representan 10 veces más nauplios eclosionados que lo reportado por (Kannan et al., 2015).

Por otra parte, entre los tratamientos evaluados, el *Aloe vera* presenta una mayor cantidad de huevos desovados, sin embargo, es el tratamiento con SFB (suero fetal bovino) el que presenta mayor cantidad de nauplios (ver Tabla 26).

Por último, la presente investigación permite afirmar, además, que la solución crioprotectora compuesta por extracto de *Aloe vera* permite la viabilidad estructural y funcional de los espermatozoides *Litopenaeus vannamei*, ya que el seguimiento hasta la fase de nauplio no mostró malformaciones ni anomalías etológicas.

8. CONCLUSIONES

- La formulación del protocolo de vitrificación óptimo para el espermatóforo de *Litopenaeus vannamei* fue obtenido empleando la solución crioprotectora conformada por *Aloe vera* 10%, $MgCl_2$ 15% y leche descremada 10% en el medio de extensión solución salina libre de calcio (SS Ca-free), durante un tiempo de exposición de 30 minutos.
- La formulación del protocolo de vitrificación óptimo para la masa espermática de *Litopenaeus vannamei* fue obtenido empleando la solución crioprotectora conformada por *Aloe vera* 10%, $MgCl_2$ 15% y leche descremada 5% en el medio de extensión solución salina libre de calcio (SS Ca-free), durante un tiempo de exposición de 15 minutos.
- La criopreservación de espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* empleando la técnica de vitrificación es más eficiente, con respecto a la viabilidad espermática, cuando se emplea como estructura reproductiva inicial el espermatóforo.

9. RECOMENDACIONES

- Durante el almacenamiento de los crioviales en el tanque contenedor de nitrógeno líquido, se recomienda que el cerrado de la tapa rosca no sea hermético, ya que los procesos de congelamiento del criovial generan un aumento en la presión interna, por lo que si se almacenan totalmente cerrados, los crioviales podrían explotar durante el proceso de descongelamiento.
- De las evaluaciones realizadas se recomienda que la adición del crioprotector permeable sea de manera gradual en la solución crioprotectora final, este procedimiento favorece la mantención de la viabilidad celular en la criopreservación de espermatozoides de *Litopenaeus vannamei*.
- El bajo rendimiento en la cantidad de nauplios eclosionados con respecto al control se debe probablemente a la baja adhesión de la masa espermática ya que no se observó la sustancia pegajosa en los espermatóforos descongelados post-vitrificación, algunos autores reportan el empleo de cianocrilato en las técnicas de inseminación artificial como agente adhesivo, por lo que se recomienda evaluar su uso en este protocolo.
- Para determinar con mayor precisión la dinámica de la criopreservación, se recomienda evaluar curvas de viabilidad de esperma criopreservada en periodos más prolongados de tiempo.
- Los resultados de la Inseminación Artificial (IA) reportados en este estudio no son estadísticamente significativos, por lo que se recomienda realizar evaluaciones de fertilidad de esperma criopreservada con un mayor número de réplicas para reducir el margen de error de los resultados en la tasa de eclosión.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abinawanto, A., Zuraida, Z., & Lestari, R. (2016). The effect of skim milk combined with 5% of methanol on motility, viability, and abnormality of Java barb, *Barbonymus gonionotus* spermatozoa after 24 hours freezing. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation-International Journal of the Bioflux Society (AAFL Bioflux)*, 9(2).

Abinawanto, S. R., & Lestari, R. (2013). Cryopreservation of Java Barb (*Barbonymus gonionotus*) Using Egg Yolk as a Cryoprotectant.

Abou-haila, A., & Tulsiani, D. R. (2009). Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of biochemistry and biophysics*, 485(1), 72-81.

Alfaro-Montoya, J. (2001) Controlled reproduction of penaeid shrimp: a contribution to its improvement. (Tesis Grado de Doctor). Wageningen University.

Alfaro Aguilera, R., Guevara Torres, M., & Gonzales Chávez, I. (2010). Prevalencia y distribución de los principales agentes etiológicos que afectan los langostinos silvestres en Tumbes, Perú. *Revista Peruana de Biología*, 17(3), 359-364.

Alfaro, J., Muñoz, N., Vargas, M., & Komen, J. (2003). Induction of sperm activation in open and closed thelycum penaeoid shrimps. *Aquaculture*, 216(1-4), 371-381.

Alfaro, J., Ulate, K., & Vargas, M. (2007). Sperm maturation and capacitation in the open thelycum shrimp *Litopenaeus* (Crustacea: Decapoda: Penaeoidea). *Aquaculture*, 270(1-4), 436-442.

Alfaro-Montoya, J. (2010). The reproductive conditions of male shrimps, genus *Penaeus*, sub-genus *Litopenaeus* (open thelyca penaeoid shrimps): a review. *Aquaculture*, 300(1-4), 1-9.

Alfaro-Montoya, J. (2013). Descripción histológica de la oogénesis y espermatogénesis del camarón de cultivo, *Litopenaeus vannamei*. *Revista de biología marina y oceanografía*, 48(2), 335-344.

Alfaro-Montoya, J., Braga, A., Vargas, M., & Umaña-Castro, R. (2016). Ultrastructural demonstration of the model of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae) male sexual maturation and spermatozoal capacitation. *Invertebrate Reproduction & Development*, 61(1), 9-17.

Arce, S. M., Moss, S. M., & Argue, B. J. (2000). Artificial insemination and spawning of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: implications for a selective breeding program. *Spawning and Maturation of Aquatic Species. Proceedings of the Twenty-Eighth US-Japan Natural Resources Aquaculture Panel. UJNR Technical Report*, 28, 5-8.

Arun, R., & Subramoniam, T. (1997). Effect of freezing rates on the survival of penaeid prawn larvae: a parameter analysis. *Cryo-letters*, 18(6), 359-368.

Au, C., Acevedo, N. C., Horner, H. T., & Wang, T. (2015). Determination of the gelation mechanism of freeze-thawed hen egg yolk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(46), 10170-10180.

Aungsuchawan, S., Browdy, C. L., & Withyachumnarnkul, B. (2011). Sperm capacitation of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture research*, 42(2), 188-195.

- Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C. & Gómez, C. (2006). Basic points in cryopreservation. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología*, 57(4), 291-300.
- Babiak, I., Glogowski, J., Brzuska, E., Szumiec, J., & Adamek, J. (1997). Cryopreservation of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Research*, 28(7), 567-571.
- Bambozzi, A. (2013). Morfologia e criopreservação do espermatozoide do camarão branco *Litopenaeus schmitti* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). (Tesis Grado de Doctor). Universidad Federal Rural de Rio de Janeiro. Bambozzi, A., de Mattos, L. A., de Mello, M. R. B., & Oshiro, L. M. Y. (2014). Criopreservação do espermatóforo e da massa espermática do camarão branco *Litopenaeus schmitti* post-mortem. *Bol. Inst. Pesca*, 40, 49-60.
- Bart, A. N., Choosuk, S., & Thakur, D. P. (2006). Spermatophore cryopreservation and artificial insemination of black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture research*, 37(5), 523-528.
- Bendich, A., Machlin, L. J., Scandurra, O., Burton, G. W., & Wayner, D. D. M. (1986). The antioxidant role of vitamin C. *Advances in Free Radical Biology & Medicine*, 2(2), 419-444.
- Boutron, P., & Peyridieu, J. F. (1994). Reduction in toxicity for red blood cells in buffered solutions containing high concentrations of 2, 3-butanediol by trehalose, sucrose, sorbitol, or mannitol. *Cryobiology*, 31(4), 367-373.
- Braga, A., de Castro, L. A. S., Poersch, L. H., & Wasielesky, W. (2014). Spermatozoal capacitation of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Aquaculture*, 430, 207-210.

Bray, W. A., & Lawrence, A. L. (1998). Male viability determinations in *Penaeus vannamei*: evaluation of short-term storage of spermatophores up to 36 h and comparison of Ca-free saline and seawater as sperm homogenate media. *Aquaculture*, 160(1-2), 63-67.

Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R., & Phillips, M. (2004). Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. *RAP publication*, 10, 92.

Burgos Namuche, M. F. (2012). Modelo de programación matemática para la optimización de las utilidades bajo niveles de riesgo en una empresa de cultivo de langostinos del Perú.

Cabrita, E., Robles, V., & Herráez, P. (Eds.). (2008). *Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species*. CRC Press.

Castelo-Branco, T., Batista, A. M., Guerra, M. M. P., Soares, R., & Peixoto, S. (2015). Sperm vitrification in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 436, 110-113.

Castelo-Branco., T. (2010). Avaliação de técnicas de criopreservação de *Litopenaeus schmitti* (Tesis post-grado) Universidade Federal Rural do rio de Janeiro instituto de zootecnia programa de pós-graduação em zootecnia.

Catcoparco, C., Dupré, E., & Espinoza, C. (2010). Criopreservación de espermatozoides de anchoveta peruana (*Engraulis ringens*). *Revista de biología marina y oceanografía*, 45(1), 121-126.

Ceballos-Vazquez, B. P., Rosas, C., & Racotta, I. S. (2003). Sperm quality in relation to age and weight of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 228(1-4), 141-151.

- Chao, N., Chen, Yu., Yang, W., & Lin, K. (2009). Cryopreservation of Spermatophores in the White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Taiwan Fisheries Research*, 17 (2): 67-76, 2009.
- Chomphuthawach, S. (2015). Development of spermatophore cryopreservation of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using domesticated broodstock. (Tesis de Grado Doctor). Burapha University.
- Chow, S., TAM, Y., & Ogasawara, Y. (1985). Cryopreservation of spermatophore of the fresh water shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. *The Biological Bulletin*, 168(3), 471-475.
- Damrongphol, P. & Akarasanon, K. (2008). Techniques for cryopreservation of spermatophores of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). In: Cabrita E, Robles V, Herráez P (Ed.). *Methods in reproductive Aquaculture: marine and freshwater Species*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008. p.509-513.
- Das, S., & Dash, H. R. (2015). *Microbial Biotechnology-A Laboratory Manual for Bacterial Systems*. Springer. DOI 10.1007/978-81-322-2095-4_2
- Diwan, A. D., & Joseph, S. (1999). Cryopreservation of spermatophores of the marine shrimp *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Indian J. Fish.*, 46(2), 159-166.
- Diwan, A. D., & Joseph, S. (2000). Cryopreservation of spermatophores of the marine shrimp *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Journal of Aquaculture in the Tropics* 15 (1) (2000) 35-43.
- Diwan, A. D., & Kandasami, K. (1997). Freezing of viable embryos and larvae of marine shrimp, *Penaeus semisulcatus* de Haan. *Aquaculture research*, 28(12), 947-950.

- Domínguez, R., Arzate, I., Chanona, J., & Welti, J. (2012). El gel de *Aloe vera*: estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Rev. Mex. Ing. Quím* vol.11 no.1 México abr. 2012.
- Dong, Q., Lin, J., & Huang, C. (2004). Effects of cryoprotectant toxicity on the embryos and larvae of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 242(1-4), 655-670.
- Espinoza C., M. Valdivia y E. Dupré. 2010. Morphological alterations in cryopreserved spermatozoa of scallop *Argopecten purpuratus*. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 38(1): 121-128.
- Evangelista, S. (2015). Empleo de antioxidantes en protocolos de criopreservación de espermatozoides. Sistema de revisiones en investigación veterinaria de San Marcos. SIRIVS. UNMSM.
- FAO (2016). El estado mundial de la pesca y acuicultura 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia.
- Fatihah, S. N., Jasmani, S., Abol-Munafi, A. B., Noorbaiduri, S., Muhd-Farouk, H., & Ikhwanuddin, M. (2016). Development of a sperm cryopreservation protocol for the mud spiny lobster, *Panulirus polyphagus*. *Aquaculture*, 462, 56-63.
- Feijó, R. (2009). Prospecção de genes relacionados à ocorrência de enfermidades no camarão *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) sob condições de cultivo. (Tesis de Maestría). Universidade federal do ceará, Fortaleza Brasil.
- Filho, I. B., Pederzoli, C. D., Sgaravatti, A. M., Gregory, R. M., Filho, C. D., Jobim, M. I. M., & Mattos, R. C. (2009). Skim milk-egg yolk based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation. *Anim. Reprod*, 6(2), 392-399.

García, J. (2002). Concentraciones en soluciones clínicas: teoría e interconversiones. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 23(1-2), 81-88.

García, M., Martínez, R. & Ruvalcaba, L. (2011). Vitricación de ovocitos y embriones. *Revista mexicana de Medicina de la reproducción* 2011; 3(4):143-149.

Garde, J. J., Del Olmo, A., Soler, A. J., Espeso, G., Gomendio, M., & Roldan, E. R. S. (2008). Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*). *Animal reproduction science*, 108(3-4), 384-401.

Goldberg, R. S., Albuquerque, F. D., & Oshiro, L. M. Y. (2000). Criopreservação de Material Genético do Camarão-de-Água-Doce *Macrobrachium rosenbergii*. *Rev. bras. zootec*, 29(6), 2157-2161.

Guertler, C. (2010). Defesa antiviral em *Litopenaeus vannamei* contra o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), induzida via RNA de interferência, e sua influência na expressão de alguns genes imunológicos. (Tesis de Maestría). Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

Guevara, M., & Alfaro, R. (2012). Patógenos introducidos al Perú en post larvas de *Litopenaeus vannamei* importadas. *Revista Peruana de Biología*, 19(2), 181-186.

Gutiérrez, G., Hernández, M., Guzmán, F., & Gonzales, P. (2014). Maduración y reproducción del camarón *Litopenaeus vannamei* en un sistema de recirculación de agua (Tamaulipas, México). *Aquacultura* 103 Jul-Ago 2014. 32-36.

Gwo, J. C. (2000). Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review. *Aquaculture Research*, 31(3), 259-271.

- Gwo, J. C., & Lin, C. H. (1998). Preliminary experiments on the cryopreservation of penaeid shrimp (*Penaeus japonicus*) embryos, nauplii and zoea. *Theriogenology*, 49(7), 1289-1299.
- Hameed, A. S., Balasubramanian, G., Musthaq, S. S., & Yoganandhan, K. (2003). Experimental infection of twenty species of Indian marine crabs with white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases of aquatic organisms*, 57(1-2), 157-161.
- Hernández-Covarrubias, V., Muñoz-Rubí, H. A., Madrid-Vera, J., & Chávez-Herrera, D. (2012). Fecundidad del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* de la plataforma continental de Sinaloa, México. *Ciencia Pesquera*, 20(2), 17-21.
- HLPE (Grupo de alto nivel de Expertos) (2014). La pesca y la acuicultura sostenibles para la seguridad alimentaria y la nutrición. Un informe del Grupo de alto nivel de expertos en seguridad alimentaria y nutrición. Informe 7 junio 2014.
- Hu, E., Cuevas-Urbe, R., Yang, H., Sanderson, R., Gill, A. O., Daniels, H., & Tiersch, T. R. (2016). High-throughput cryopreservation of sperm from sex-reversed Southern Flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(4), 555-565.
- Hubalek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46(3), 205-229.
- Husien, S. & Aguillón, C. (2008). Manual de reproducción y cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura CENDEPESCA. El Salvador.
- Jamur, M. C., & Oliver, C. (2010). Permeabilization of cell membranes. *In*

Immunocytochemical methods and protocols (pp. 63-66). Humana Press.

Jang, T. H., Park, S. C., Yang, J. H., Kim, J. Y., Seok, J. H., Park, U. S., ... & Han, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative medicine research*, 6(1), 12-18.

Jeyalectumie, C., & Subramoniam, T. (1989). Cryopreservation of spermatophores and seminal plasma of the edible crab *Scylla serrata*. *The Biological Bulletin*, 177(2), 247-253.

Jiménez-Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A. E., Rodríguez-Serrano, G., López-Munguía, A., Gómez-Ruiz, L., & García-Garibay, M. (2002). Enhancement of lactase activity in milk by reactive sulfhydryl groups induced by heat treatment. *Journal of dairy science*, 85(10), 2497-2502.

Kannan, D., Thirunavukkarasu, P., Jagadeesan, K., Shettu, N., & Kumar, A. (2015). Procedure for maturation and spawning of imported shrimp *Litopenaeus vannamei* in commercial hatchery, South East Coast of India. *Fish Aquaculture Journal*, 6, 146-151.

Ke, Y & Cai, N. (1996). Cryopreservation of spermatozoa from de the marine shrimp *Penaeus chinensis*, *Oceanología y Limnologia Sinica*. Vol. 27. No. 2. Marzo 1996.

Kerby, J. H. (1983). Cryogenic preservation of sperm from striped bass. *Transactions of the American Fisheries Society*, 112(1), 86-94.

Khalili, B., Jafaroghli, M., Farshad, A., & Paresh-Khiavi, M. (2010). 43 the effects of different concentrations of Glycine and cysteine on the freezability of Moghani ram spermatozoa. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(3), 318.

Kurokura, H. (1979). *Studies of preservation of salmon and trout sperm (Doctoral dissertation, Doctoral dissertation. Tokyo University, Tokyo)*.

Labbé, C., Robles, V., & Herraéz, M. P. (2013). Cryopreservation of gametes for aquaculture and alternative cell sources for genome preservation. *In Advances in Aquaculture Hatchery Technology* (pp. 76-116).

Lewis, J. G., Learmonth, R. P., & Watson, K. (1994). Cryoprotection of yeast by alcohols during rapid freezing. *Cryobiology*, 31(2), 193-198.

Lezcano, M. (2001). Evaluación de cuatro agentes crioprotectores en la criopreservación de espermátóforos, masa y suspensión espermática del camarón marino *Litopenaeus vannamei* (Boones, 1931). (Tesis de Grado). Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.

Lezcano, M., Granja, C., & Salazar, M. (2004). The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Cryobiology*, 48(3), 349-356.

Li, Z., Lin, Q., Liu, R., Xiao, W., & Liu, W. (2010). Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. *Journal of andrology*, 31(5), 437-444.

Lichtenstein, G. (2009). *Desarrollo e implementación de técnicas para la criopreservación de esperma de pejerrey bonaerense Odonstesthes bonariensis* (Doctoral dissertation, Universidad de Belgrano. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Carrera de Ciencias Biológicas).

Liu, Q., Wang, X., Wang, W., Zhang, X., Xu, S., Ma, D. & Li, J. (2015). Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function in red seabream (*Pagrus major*) sperm cryopreservation. *Fish physiology and biochemistry*, 41(2), 413-422.

Maldonado, M. (2003). *Respuesta inmunitaria en familias de Litopenaeus vannamei, bajo condiciones de infección con WSSV y el efecto de la adición de β -1, 3 glucanos* (Doctoral dissertation, Tesis de Magister). Instituto Nacional Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador).

Mancisidor Solorzano, I. B. (2013). Efecto del α -tocoferol durante el proceso de criopreservación en espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis de pregrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Maria, A. N., Viveiros, A. T. M., Freitas, R. T. F., & Oliveira, A. V. (2006). Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*, 260(1-4), 298-306.

Martínez-Páramo, S., Horváth, Á., Labbé, C., Zhang, T., Robles, V., Herráez, P., Suquet, M., Adams, S., Viveiros, A., Tiersch, & T. & Cabrita, E. (2017). Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*, 472, 156-177.

Melo-Maciel, M. A. P., Leite-Castro, L. V., Leite, J. S., Oliveira, M. S., Almeida-Monteiro, P. S., Nunes, J. F., & Salmito-Vanderley, C. S. B. (2015). *Aloe vera* in the cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) sperm. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 67(3), 945-949.

Memon, A. J., Talpur, A. D., Khan, M. I., Fariddudin, M. O., Safiah, J., Abol-Munafi, A. B., & Ikhwanuddin, M. (2012). Optimization of spermatophores cryopreservation protocol of banana shrimp (*Penaeus merguensis*)(De Man, 1888). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(10), 1688-1704.

- Méndez, G. (1981). Claves de identificación y distribución de los langostinos y camarones (Crustacea: Decapoda) del mar y ríos de la costa del Perú. Instituto del mar del Perú. Boletín Vol. 5. ISSN-0378-7669. Callao, Perú.
- Mendoza-Cano, F., Grijalva-Chon, J. M., Pérez-Enríquez, R., Ramos-Paredes, J., & Varela-Romero, A. (2013). Genetic diversity of mitochondrial DNA from *Litopenaeus vannamei* broodstock used in northwestern Mexico. *Ciencias Marinas*, 39(4), 401-412.
- Michel, E. H. (2002). Taxonomía, Biología y Zoogeografía de los Peneidos de Importancia Comercial del Pacífico Mexicano. Unidad Académica Mazatlán, Ins. Cien. Mar y Limnol., UNAM México, 15-34.
- Miranda, I., Valles, J. L., Sánchez, R., & Álvarez, Z. (2010). Cultivo del camarón marino *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) en agua dulce. *Revista Científica*, 20(4), 339-346.
- Mirzoyan, A. V., Nebesikhina, N. A., Voynova, N. V., & Chistyakov, V. A. (2006). Preliminary results on ascorbic acid and lysine suppression of clastogenic effect of deep-frozen sperm of the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*). *International journal of refrigeration*, 29(3), 374-378.
- Misamore, M. J., & Browdy, C. L. (1996). Mating behavior in the white shrimps *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*: a generalized model for mating in *Penaeus*. *Journal of Crustacean Biology*, 16(1), 61-70.
- Montes Montes, M. (2012). Evaluación de la calidad espermática y ensayos preliminares en Criopreservación de espermatozoides de Lengado *Paralichthys Adspersus* (Steindachner, 1867). (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Morales-Covarrubias, M. S., Ruiz-Luna, A., Pereira Moura-Lemus, A., Solís Montiel, V. T., & Conroy, G. (2011). Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de Latinoamérica. *Revista Científica*, 21(5).

Morales-Ueno, K., Montaldo, H. H., Ortega, A. M., Paniagua-Chávez, C. G., & Castillo-Juárez, H. (2013). An extender solution for the short-term storage of *Litopenaeus vannamei* sperm to be used in artificial insemination. *Aquaculture Research*, 44(8), 1254-1258.

Moscoso, V. (2014). Catálogo de crustáceos decápodos y estomatópodos del Perú. Boletín del Instituto del Mar del Perú. Volumen 27, Numero 1-2. ISSN 0458-7766. Pag. 28.

Motte, E., Yugcha, E., Luzardo, J., Castro, F., Leclercq, G., Rodríguez, J., Miranda, P., Borja, O., Serrano, J., Terreros, M., Montalvo, K., Narváez, A., Tenorio, N., Cedeño, V., Mialhe, E., & Boulo, V. (2003). Prevention of IHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 219(1-4), 57-70.

Muchlisin, Z. A. (2005). Current status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 6(1).

Nimrat, S., Bart, A. N., Keatsaksit, A., & Vuthiphandchai, V. (2008). Microbial flora of spermatophores from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) declines over long-term cryostorage. *Aquaculture*, 274(2-4), 247-253.

Nimrat, S., Siriboonlamom, S., Zhang, S., Xu, Y., & Vuthiphandchai, V. (2006). Chilled storage of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) spermatophores. *Aquaculture*, 261(3), 944-951.

Niu, J., TIAN, L. X., LIU, Y. J., MAI, K. S., YANG, H. J., YE, C. X., & Gao, W. (2009). Nutrient values of dietary ascorbic acid (l-ascorbyl-2-polyphosphate) on growth, survival and stress tolerance of larval shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture nutrition*, 15(2), 194-201.

Pardo-Carrasco, S., Salas Villalva, J., Reza Gaviria, L., Espinosa Araujo, J., & Atencio-García, V. (2015). Cryopreservation of Trans-Andean shovelnose catfish (*Sorubim cuspicaudus*) semen using dimethylacetamide. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 10(2), 122-131.

Pegg, D. E. (2007). Principles of cryopreservation. In *Cryopreservation and freeze-drying protocols* (pp. 39-57). Humana Press.

Pérez Jar, L. (2005). Fisiología y calidad reproductiva de machos de camarón blanco *Litopenaeus schmitti* en condiciones de cautiverio.

Pérez, F., Gómez, L., Otero, V., Volckaert, F., & Calderón, J. (2002). Supervivencia diferencial de familias *Litopenaeus vannamei* desafiadas con el WSSV. CENAIM-ESPOL VI Congreso ecuatoriano de acuicultura.

Pongtippatee, P., Vanichviriyakit, R., Chavadej, J., Plodpai, P., Pratoomchart, B., Sobhon, P., & Withyachumnarnkul, B. (2007). Acrosome reaction in the sperm of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture Research*, 38(15), 1635-1644.

PRODUCE (Ministerio de la Producción) (2015). Anuario estadístico pesquero y Acuícola 2015. Lima, Perú.

- Qiao, J., Du, Z., Zhang, Y., Du, H., Guo, L., Zhong, M., Cao, J. & Wang, X. (2011) Proteomic identification of the related immune-enhancing proteins in shrimp *Litopenaeus vannamei* stimulated with vitamin C and Chinese herbs. *Fish & shellfish immunology*, 31(6), 736-745.
- Rahman, S. M., Strüssmann, C. A., Majhi, S. K., Suzuki, T., & Watanabe, M. (2011). Efficiency of osmotic and chemical treatments to improve the permeation of the cryoprotectant dimethyl sulfoxide to Japanese whiting (*Sillago japonica*) embryos. *Theriogenology*, 75(2), 248-255.
- Ramírez, G. J. A., Fernández, A. G., Jiménez, C. J. A., & Cosme, R. W. (2006). Agua de coco, suero fetal bovino, Aloe vera y sus combinaciones para criopreservar semen ovino. *Archivos de zootecnia*, 55(209), 101-104.
- Robles-Mancilla, M. A. (2006). Infección experimental del camarón blanco *litopenaeus vannamei* con spiroplasma panaei y respuesta de la enfermedad a tres antibióticos y un probiótico (Tesis de Grado). Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.
- Robles, V. M. M., Santamaría, Y. V., & Casallas, P. E. C. (2005). Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(1), 34-48.
- Rodríguez, M., & Nivia, A. (2017). Efecto de la adición de antioxidantes sobre la motilidad espermática post-criopreservación y fertilidad del semen de peces. *Revista Veterinaria*, 28(2), 157-164.
- Salazar, M., Lezcano, M. & Granja, C. (2008). Protocol for cryopreservation of *Penaeus vannamei* sperm cells. In: Cabrita E, Robles V, Herráez P (Ed.). *Methods in reproductive*

Aquaculture: marine and freshwater Species. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008. p.505-508.

Shrimp news international. (n.d.). Tomado de:

<http://www.shrimpnews.com/FreeReportsFolder/GeneralInformationFolder/About.html>

SINACYT (2006). Plan Nacional Estratégico de Ciencia Tecnología e Innovación para la Competitividad y el Desarrollo Humano 2006-2021. Lima: Concytec. Obtenido de https://portal.concytec.gob.pe/images/stories/images2012/portal/áreasinstitucion/pyp/plan_nac_ctei/plan_nac_ctei_2006_2021.pdf.

Souza, A. L. P., Lima, G. L., Peixoto, G. C. X., Silva, A. M., Oliveira, M. F., & Silva, A. R. (2016). Use of Aloe vera–based extender for chilling and freezing collared peccary (*Pecari tajacu*) semen. *Theriogenology*, 85(8), 1432-1438.

Steponkus, P. L., Myers, S. P., Lynch, D. V., Gardner, L., Bronshteyn, V., Leibo, S. P., ... & MacIntyre, R. J. (1990). Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature*, 345(6271), 170.

Suarez, M. (2014). Efecto de la suplementación de L-cisteína en el dilutor tes-tris-yema, sobre la calidad espermática post-descongelamiento en alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis de Grado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Talavera, V., Sánchez, D., Zapata L., (1999). La acuicultura potencial de camarón y otras especies acuícolas en los desiertos. *Boletín nicovita* Vol. 04. Ed. 8 Tumbes. Perú.

Tiersch, T. R., & Mazik, P. M. (Eds.). (2000). Cryopreservation in aquatic species. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society.

Tsai, S., Chong, G., Meng, P. J., & Lin, C. (2017). Sugars as supplemental cryoprotectants for marine organisms. *Reviews in Aquaculture*. (2017) 0, 1-13.

Uberti, M. (2012). Evaluación de la Integridad de células espermáticas de *Litopenaeus vannamei* sometidas a criopreservación. (Tesis de Maestría). Universidad Federal de Santa Catarina.

Uberti, M. F., Vieira, F. D. N., Salência, H. R., Vieira, G. D. S., & Vinatea, L. A. (2014). Assessment of viability of sperm cells of *Litopenaeus vannamei* on cryopreservation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(3), 374-380.

Valentina, P., Narasimman, S. & Natesan, M. (2016). Effect of cryoprotectans and cooling rates on fertility potential of sperm in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Animal Reproduction Science* (2016).

Vázquez-Islas, G., Racotta, I. S., Robles-Romo, A., & Campos-Ramos, R. (2013). Energy balance of spermatophores and sperm viability during the molt cycle in intact and bilaterally eyestalk ablated male Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 414, 1-8.

Veloso, A., Warr, G. W., Browdy, C. L., & Chapman, R. W. (2011). The transcriptomic response to viral infection of two strains of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Developmental & Comparative Immunology*, 35(3), 241-246.

Vuthiphandchai, V., Chomphuthawach, S., & Nimrat, S. (2009). Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. *Theriogenology*, 72(1), 129-138.

- Vuthiphandchai, V., Nimrat, S., Kotcharat, S., & Bart, A. N. (2007). Development of a cryopreservation protocol for long-term storage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores. *Theriogenology*, 68(8), 1192-1199.
- Vuthiphandchai, V., Pengpun, B., & Nimrat, S. (2005). Effects of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 246(1-4), 275-284.
- Wang, Q., Misamore, M., Jiang, C. Q., & Browdy, C. L. (1995). Egg water induced reaction and biostain assay of sperm from marine shrimp *Penaeus vannamei*: dietary effects on sperm quality. *Journal of the world aquaculture society*, 26(3), 261-271.
- Yang, C., Zhao, Y., Chen, X., Li, Y., Peng, M., Yang, Y. & Chen, X. (2013). Spermatozoa cryopreservation of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Southern Agriculture*, 44(8), 1382-1389.
- Yanza, G., & Humberto, M. (2017). *Efecto del extracto del Aloe vera (Aloe barbadensis miller) en la congelabilidad del semen porcino* (Master's thesis).
- Yavaş, İ., Bozkurt, Y., & Yıldız, C. (2014). Cryopreservation of scaly carp (*Cyprinus carpio*) sperm: effect of different cryoprotectant concentrations on post-thaw motility, fertilization and hatching success of embryos. *Aquaculture international*, 22(1), 141-148.
- Yong, S. Y., Nguang, S. I., & Kari, A. (2017). Comparison between the effect of egg yolk-based extender and aloe vera (*Aloe barbadensis*)-based extender on red tilapia (*Oreochromis niloticus*) sperm quality. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 9(2S), 813-820.

Zafra, A., Siccha, M., Ugaz, L., Siccha, C., González, F., Correa, J., Vela, Kriss., Castro J., & Castillo J. (2012). Crianza experimental de post-larvas de *Litopenaeus vannamei* a diferente densidad en sistema cerrado (Trujillo, Perú). *Rebiol.* 23(1): 86-103.

Zhang, Y. Z., Zhang, S. C., Liu, X. Z., Xu, Y. Y., Wang, C. L., Sawant, M. S., ... & Chen, S. L. (2003). Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. *Theriogenology*, 60(5), 989-996.

Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, V., Storelli, C., & Vilella, S. (2003). Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology*, 47(3), 227-235.

11. ANEXOS

11.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

11.1.1. Determinación de las Soluciones de Extensión

Los datos de la viabilidad espermática mostraron una distribución normal en cada tratamiento para el espermátforo (E) y la masa espermática (ME).

Pruebas de normalidad							
	Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Viabilidad espermática E (%)	Control	,281	5	,200 [*]	,808	5	,094
	SS Ca-free	,238	5	,200 [*]	,957	5	,784
	SR	,188	5	,200 [*]	,960	5	,811
	SBP	,310	5	,131	,895	5	,383
Viabilidad espermática ME (%)	Control	,281	5	,200 [*]	,808	5	,094
	SS Ca-free	,275	5	,200 [*]	,891	5	,364
	SR	,136	5	,200 [*]	,989	5	,976
	SBP	,257	5	,200 [*]	,845	5	,178

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

ESPERMATÓFORO

Prueba de homogeneidad de varianzas

Viabilidad espermática E (%)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3,179	3	16	,053

La prueba de Levene respaldó la homogeneidad de varianzas.

Descriptivos

Viabilidad espermática E (%)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control	5	91,6800	4,07333	1,82165	86,6223	96,7377	84,80	94,80

SS Ca-free	5	76,4000	9,05539	4,04969	65,1563	87,6437	63,20	86,80
SR	5	12,5600	9,75131	4,36092	,4522	24,6678	2,00	26,40
SBP	5	6,0800	3,15468	1,41082	2,1629	9,9971	2,80	11,20
Total	20	46,6800	39,34904	8,79871	28,2641	65,0959	2,00	94,80

ANOVA de un factor

Viabilidad espermática E (%)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	28604,064	3	9534,688	187,293	,000
Intra-grupos	814,528	16	50,908		
Total	29418,592	19			

Como el nivel de significación (sig.) es menor o igual que 0,05, rechazamos la hipótesis de igualdad de medias, es decir, existen diferencias significativas entre los grupos.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Viabilidad espermática E (%)

HSD de Tukey

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Control	SS Ca-free	15,28000*	4,51256	,018	2,3695	28,1905
	SR	79,12000*	4,51256	,000	66,2095	92,0305
	SBP	85,60000*	4,51256	,000	72,6895	98,5105
SS Ca-free	Control	-15,28000*	4,51256	,018	-28,1905	-2,3695
	SR	63,84000*	4,51256	,000	50,9295	76,7505
	SBP	70,32000*	4,51256	,000	57,4095	83,2305
SR	Control	-79,12000*	4,51256	,000	-92,0305	-66,2095
	SS Ca-free	-63,84000*	4,51256	,000	-76,7505	-50,9295
	SBP	6,48000	4,51256	,496	-6,4305	19,3905
SBP	Control	-85,60000*	4,51256	,000	-98,5105	-72,6895
	SS Ca-free	-70,32000*	4,51256	,000	-83,2305	-57,4095
	SR	-6,48000	4,51256	,496	-19,3905	6,4305

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Viabilidad espermática E (%)

HSD de Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
SBP	5	6,0800		
SR	5	12,5600		
SS Ca-free	5		76,4000	
Control	5			91,6800
Sig.		,496	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Según las pruebas estadísticas de ANOVA y Tukey, se concluye que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

MASA ESPERMÁTICA

Prueba de homogeneidad de varianzas

Viabilidad espermática ME (%)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
6,173	3	16	,005

La prueba de Levene respalda la homogeneidad de varianzas.

Descriptivos

Viabilidad espermática ME (%)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control	5	91,6800	4,07333	1,82165	86,6223	96,7377	84,80	94,80
SS Ca-free	5	80,8800	12,19639	5,45439	65,7362	96,0238	62,00	92,00
SR	5	3,9200	1,39714	,62482	2,1852	5,6548	2,00	5,60
SBP	5	5,5200	4,43080	1,98151	,0184	11,0216	2,00	12,80
Total	20	45,5000	42,49203	9,50151	25,6131	65,3869	2,00	94,80

ANOVA de un factor

Viabilidad espermática ME (%)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	33558,168	3	11186,056	239,366	,000
Intra-grupos	747,712	16	46,732		
Total	34305,880	19			

Como el nivel de significación (sig.) es menor o igual que 0,05, rechazamos la hipótesis de igualdad de medias, es decir, existen diferencias significativas entre los grupos.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Viabilidad espermática ME (%)

HSD de Tukey

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Control	SS Ca-free	10,80000	4,32352	,098	-1,5697	23,1697
	SR	87,76000*	4,32352	,000	75,3903	100,1297
	SBP	86,16000*	4,32352	,000	73,7903	98,5297
SS Ca-free	Control	-10,80000	4,32352	,098	-23,1697	1,5697
	SR	76,96000*	4,32352	,000	64,5903	89,3297
	SBP	75,36000*	4,32352	,000	62,9903	87,7297
SR	Control	-87,76000*	4,32352	,000	-100,1297	-75,3903
	SS Ca-free	-76,96000*	4,32352	,000	-89,3297	-64,5903
	SBP	-1,60000	4,32352	,982	-13,9697	10,7697
SBP	Control	-86,16000*	4,32352	,000	-98,5297	-73,7903
	SS Ca-free	-75,36000*	4,32352	,000	-87,7297	-62,9903
	SR	1,60000	4,32352	,982	-10,7697	13,9697

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Viabilidad espermática ME (%)

HSD de Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
SR	5	3,9200	
SBP	5	5,5200	

SS Ca-free	5		80,8800
Control	5		91,6800
Sig.		,982	,098

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Según las pruebas estadísticas de ANOVA y Tukey, se concluye que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

11.1.2. Determinación de las Combinaciones de Crioprotector Permeable, Concentración y Tiempo de Exposición

ESPERMATOFORO

a) Metanol

La distribución de los porcentajes de viabilidad espermática evaluados con metanol mostró una distribución normal ($\text{sig} > 0.05$).

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Viabilidad espermática E (%)	ArcSin Viabilidad espermática E (%)
N		75	75
Parámetros normales ^{a,b}	Media	86,0107	1,2137
	Desviación típica	10,20206	,15683
	Absoluta	,106	,084
Diferencias más extremas	Positiva	,085	,084
	Negativa	-,106	-,049
Z de Kolmogorov-Smirnov		,919	,725
Sig. asintót. (bilateral)		,367	,669

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

La prueba de Levene con una $\text{sig}.0.00 < 0.05$ indica que las varianzas son heterogéneas.

Prueba de homogeneidad de varianzas

Viabilidad espermática E (%)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
4,674	14	60	,000

Como los datos poseen una distribución normal pero las varianzas no son homogéneas se empleó el ANOVA de Welch y el test de Tukey.

ANOVA de un factor

Viabilidad espermática E (%)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4919,927	14	351,423	7,579	,000
Intra-grupos	2782,144	60	46,369		
Total	7702,071	74			

Pruebas robustas de igualdad de las medias

Viabilidad espermática E (%)

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch	33,593	14	21,551	,000

a. Distribuidos en F asintóticamente.

Viabilidad espermática E (%)

HSD de Tukey^a

Tratamiento_General	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
MeOH 10% 60 min	5	69,2000					
MeOH 15% 60 min	5	75,5200	75,5200				
MeOH 20% 60 min	5	79,1200	79,1200	79,1200			
MeOH 10% 30 min	5	79,2000	79,2000	79,2000			
MeOH 20% 30 min	5	81,9200	81,9200	81,9200	81,9200		
MeOH 15% 30 min	5	83,2000	83,2000	83,2000	83,2000	83,2000	
MeOH 30% 60 min	5		84,9600	84,9600	84,9600	84,9600	84,9600
MeOH 30% 30 min	5		86,6400	86,6400	86,6400	86,6400	86,6400
MeOH 20% 15 min	5		86,6400	86,6400	86,6400	86,6400	86,6400
MeOH 15% 15 min	5		88,9600	88,9600	88,9600	88,9600	88,9600
MeOH 30% 15 min	5		89,2000	89,2000	89,2000	89,2000	89,2000
MeOH 10% 15 min	5			92,8000	92,8000	92,8000	92,8000
Control 60 min	5				96,5600	96,5600	96,5600

Control 15 min	5					97,2800	97,2800
Control 30 min	5						98,9600
Sig.		,104	,124	,124	,072	,099	,104

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Según las pruebas estadísticas ANOVA y Test de Tukey, se concluye que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

b) DMSO

La distribución de los porcentajes de viabilidad espermática evaluados con DMSO mostró una distribución normal ($\text{sig } 0.639 > 0.05$).

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Viabilidad espermática E (%)	ArcSin Viabilidad espermática E (%)
N		75	75
Parámetros normales ^{a,b}	Media	89,8703	1,2719
	Desviación típica	8,49997	,13741
	Absoluta	,143	,086
Diferencias más extremas	Positiva	,136	,064
	Negativa	-,143	-,086
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,240	,743
Sig. asintót. (bilateral)		,092	,639

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

La prueba de Levene con una $\text{sig. } 0.00 < 0.05$ indica que las varianzas son heterogéneas.

Prueba de homogeneidad de varianzas

Viabilidad espermática E (%)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
4,874	14	60	,000

Como los datos poseen una distribución normal pero las varianzas no son homogéneas se empleó el ANOVA de Welch y el test de Tukey.

ANOVA de un factor

Viabilidad espermática E (%)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3722,781	14	265,913	9,826	,000
Intra-grupos	1623,686	60	27,061		
Total	5346,467	74			

Pruebas robustas de igualdad de las medias

Viabilidad espermática E (%)

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch	34,464	14	21,749	,000

a. Distribuidos en F asintóticamente.

Viabilidad espermática E (%)

HSD de Tukey^a

Tratamiento_General	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
DMSO 10% 60 min	5	75,1740			
DMSO 30% 60 min	5	77,0400			
DMSO 10% 30 min	5	81,1200	81,1200		
DMSO 30% 30 min	5	85,1200	85,1200	85,1200	
DMSO 20% 60 min	5		88,9600	88,9600	88,9600
DMSO 15% 60 min	5		90,1600	90,1600	90,1600
DMSO 20% 15 min	5		90,3200	90,3200	90,3200
DMSO 10% 15 min	5		91,1200	91,1200	91,1200
DMSO 30% 15 min	5		92,3200	92,3200	92,3200
DMSO 15% 30 min	5			92,8000	92,8000
DMSO 15% 15 min	5			95,0400	95,0400
DMSO 20% 30 min	5			96,0800	96,0800
Control 60 min	5			96,5600	96,5600
Control 15 min	5				97,2800
Control 30 min	5				98,9600
Sig.		,175	,071	,059	,169

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Según las pruebas estadísticas ANOVA y Test de Tukey, se concluye que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

c) MgCl₂

La distribución de los porcentajes de viabilidad espermática no mostro una distribución normal a pesar de la transformación de los datos (sig<0.05).

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Viabilidad espermática E (%)	ArcSin Viabilidad espermática E (%)
N		75	75
Parámetros normales ^{a,b}	Media	93,3421	1,3374
	Desviación típica	6,30168	,12135
	Absoluta	,200	,164
Diferencias más extremas	Positiva	,176	,118
	Negativa	-,200	-,164
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,732	1,421
Sig. asintót. (bilateral)		,005	,035

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

La prueba de Levene con una sig.0.00<0.05 indica que las varianzas son heterogéneas.

Prueba de homogeneidad de varianzas

Viabilidad espermática E (%)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
9,123	14	60	,000

Debido a los resultados anteriores se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para evaluar la diferencia estadística de los tratamientos y se respaldaron los resultados con un ANOVA y el test de Tukey.

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Viabilidad espermática E (%) es la misma entre las categorías de Tratamiento_General.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

ANOVA de un factor

Viabilidad espermática E (%)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2117,602	14	151,257	11,054	,000
Intra-grupos	821,029	60	13,684		
Total	2938,631	74			

Pruebas robustas de igualdad de las medias

Viabilidad espermática E (%)

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch	55,219	14	22,218	,000

a. Distribuidos en F asintóticamente.

Viabilidad espermática E (%)

HSD de Tukey^a

Tratamiento_General	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
MgCl2 15% 30 min	5	81,4840			
MgCl2 30% 15 min	5	84,9600	84,9600		
MgCl2 30% 30 min	5	86,7280	86,7280		
MgCl2 30% 60 min	5	87,8400	87,8400	87,8400	
MgCl2 20% 60 min	5		90,9600	90,9600	90,9600
MgCl2 10% 30 min	5			95,1200	95,1200
MgCl2 20% 30 min	5			95,6800	95,6800
MgCl2 20% 15 min	5			95,8400	95,8400
MgCl2 10% 60 min	5				96,1600

Control 60 min	5				96,5600
MgCl2 10% 15 min	5				97,2000
Control 15 min	5				97,2800
MgCl2 15% 60 min	5				97,3600
MgCl2 15% 15 min	5				98,0000
Control 30 min	5				98,9600
Sig.		,320	,413	,068	,068

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Según las pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas, se concluye que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

d) 2-propanol

La distribución de los porcentajes de viabilidad espermática no mostro una distribución normal a pesar de la transformación de los datos (sig<0.05).

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Viabilidad espermática ME (%)	ArcSin Viabilidad espermática ME (%)
N		75	75
Parámetros normales ^{a,b}	Media	20,0213	,3081
	Desviación típica	38,24269	,54037
	Absoluta	,447	,376
Diferencias más extremas	Positiva	,447	,376
	Negativa	-,300	-,284
Z de Kolmogorov-Smirnov		3,872	3,252
Sig. asintót. (bilateral)		,000	,000

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

La prueba de Levene con una sig.0.00<0.05 indica que las varianzas son heterogéneas.

Prueba de homogeneidad de varianzas

Viabilidad espermática E (%)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
5,158	14	60	,000

Debido a los resultados anteriores se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para evaluar la diferencia estadística de los tratamientos y se respaldaron los resultados con un ANOVA y el test de Tukey.

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Viabilidad espermática E (%) es la misma entre las categorías de Tratamiento_General.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

ANOVA de un factor

Viabilidad espermática E (%)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	125740,858	14	8981,490	182,824	,000
Intra-grupos	2947,593	60	49,127		
Total	128688,451	74			

Pruebas robustas de igualdad de las medias^b

Viabilidad espermática E (%)

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch

a. Distribuidos en F asintóticamente.

b. No se pueden realizar las pruebas robustas de la igualdad de medias para Viabilidad espermática E (%) porque al menos un grupo tiene varianza 0.

Viabilidad espermática E (%)

HSD de Tukey^a

Tratamiento_General	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
2-prop 20% 30 min	5	,0000			
2-prop 20% 60 min	5	,0000			
2-prop 30% 30 min	5	,0000			

2-prop 30% 60 min	5	,0000			
2-prop 15% 30 min	5	,0800			
2-prop 20% 15 min	5	,2400			
2-prop 30% 15 min	5	,7780			
2-prop 15% 15 min	5	1,5200			
2-prop 15% 60 min	5	2,7200			
2-prop 10% 60 min	5		44,3200		
2-prop 10% 30 min	5		59,9200		
2-prop 10% 15 min	5			81,1920	
Control 60 min	5			96,5600	96,5600
Control 15 min	5				97,2800
Control 30 min	5				98,9600
Sig.		1,000	,052	,060	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Según las pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas, se concluye que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

MASA ESPERMATICA

a) Metanol

La distribución de los porcentajes de viabilidad espermática para el metanol no mostro una distribución normal a pesar de la transformación de los datos (sig<0.05).

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Viabilidad espermática ME (%)	ArcSin Viabilidad espermática ME (%)
N		75	75
Parámetros normales ^{a,b}	Media	43,8400	,6892
	Desviación típica	38,90346	,49746
	Absoluta	,212	,175
Diferencias más extremas	Positiva	,212	,163
	Negativa	-,198	-,175
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,839	1,515
Sig. asintót. (bilateral)		,002	,020

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

La prueba de Levene con una sig.0.00<0.05 indica que las varianzas son heterogéneas.

Prueba de homogeneidad de varianzas

Viabilidad espermática ME (%)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
10,112	14	60	,000

Debido a los resultados anteriores se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para evaluar la diferencia estadística de los tratamientos y se respaldaron los resultados con un ANOVA y el test de Tukey.

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Viabilidad espermática ME (%) es la misma entre las categorías de Tratamiento_General.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

ANOVA de un factor

Viabilidad espermática ME (%)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	103744,384	14	7410,313	53,873	,000
Intra-grupos	8253,056	60	137,551		
Total	111997,440	74			

Pruebas robustas de igualdad de las medias

Viabilidad espermática ME (%)

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch	2205,332	14	21,537	,000

a. Distribuidos en F asintóticamente.

Viabilidad espermática ME (%)

HSD de Tukey^a

Tratamiento_General	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3

MeOH 30% 60 min	5	,2400		
MeOH 30% 15 min	5	2,8000		
MeOH 20% 60 min	5	5,2000		
MeOH 20% 30 min	5	6,8000		
MeOH 30% 30 min	5	8,2400		
MeOH 20% 15 min	5	16,2400		
MeOH 15% 30 min	5	20,9600		
MeOH 15% 60 min	5	24,5600		
MeOH 15% 15 min	5		56,0000	
MeOH 10% 30 min	5		75,8400	75,8400
MeOH 10% 60 min	5		76,8800	76,8800
MeOH 10% 15 min	5		77,9200	77,9200
Control 30 min	5			93,9200
Control 15 min	5			96,0000
Control 60 min	5			96,0000
Sig.		,097	,202	,320

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Según las pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas, se concluye que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

b) DMSO

La distribución de los porcentajes de viabilidad espermática mostro una distribución normal únicamente con la transformación arcoseno de los datos (sig. 0.346>0.05).

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Viabilidad espermática ME (%)	ArcSin Viabilidad espermática ME (%)
N		75	75
Parámetros normales ^{a,b}	Media	92,2987	1,3084
	Desviación típica	6,48594	,11005
	Absoluta	,172	,108
Diferencias más extremas	Positiva	,144	,058
	Negativa	-,172	-,108

Z de Kolmogorov-Smirnov	1,485	,935
Sig. asintót. (bilateral)	,024	,346

- La distribución de contraste es la Normal.
- Se han calculado a partir de los datos.

La prueba de Levene con una sig.0,533<0.05 indica que las varianzas son heterogéneas

Prueba de homogeneidad de varianzas

ArcSin Viabilidad espermática ME (%)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
	14	60	,533

Como los datos poseen una distribución normal y las varianzas son homogéneas se empleó el ANOVA y el test de Tukey.

ANOVA de un factor

ArcSin Viabilidad espermática ME (%)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,533	14	,038	6,292	,000
Intra-grupos	,363	60	,006		
Total	,896	74			

ArcSin Viabilidad espermática ME (%)

HSD de Tukey^a

Tratamiento_General	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
DMSO 30% 60 min	5	1,0692		
DMSO 30% 30 min	5	1,1835	1,1835	
DMSO 20% 60 min	5		1,2459	1,2459
DMSO 30% 15 min	5		1,2715	1,2715
DMSO 15% 60 min	5		1,3031	1,3031
DMSO 10% 30 min	5		1,3231	1,3231
DMSO 15% 30 min	5		1,3231	1,3231
Control 30 min	5		1,3302	1,3302
DMSO 20% 30 min	5		1,3427	1,3427
DMSO 15% 15 min	5		1,3447	1,3447
DMSO 10% 60 min	5			1,3640

DMSO 20% 15 min	5			1,3659
Control 60 min	5			1,3776
Control 15 min	5			1,3803
DMSO 10% 15 min	5			1,4021
Sig.		,579	,097	,125

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Según las pruebas estadísticas ANOVA y Test de Tukey, se concluye que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

c) MgCl₂

La distribución de los porcentajes de viabilidad espermática no mostro una distribución normal a pesar de la transformación de los datos (sig<0.05).

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Viabilidad espermática ME (%)	ArcSin Viabilidad espermática ME (%)
N		75	75
Parámetros normales ^{a,b}	Media	29,1147	,4458
	Desviación típica	41,35417	,57288
	Absoluta	,355	,292
Diferencias más extremas	Positiva	,355	,292
	Negativa	-,241	-,218
Z de Kolmogorov-Smirnov		3,076	2,529
Sig. asintót. (bilateral)		,000	,000

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

La prueba de Levene con una sig.0.00<0.05 indica que las varianzas son heterogéneas.

Prueba de homogeneidad de varianzas

Viabilidad espermática ME (%)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
18,912	14	60	,000

Debido a los resultados anteriores se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para evaluar la diferencia estadística de los tratamientos y se respaldaron los resultados con un ANOVA y el test de Tukey.

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Viabilidad espermática ME (%) es la misma entre las categorías de Tratamiento_General.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

ANOVA de un factor

Viabilidad espermática ME (%)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	101498,974	14	7249,927	17,363	,000
Intra-grupos	25053,440	60	417,557		
Total	126552,414	74			

Pruebas robustas de igualdad de las medias^b

Viabilidad espermática ME (%)

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch

a. Distribuidos en F asintóticamente.

b. No se pueden realizar las pruebas robustas de la igualdad de medias para Viabilidad espermática ME (%) porque al menos un grupo tiene varianza 0.

Viabilidad espermática ME (%)

HSD de Tukey^a

Tratamiento_General	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
MgCl2 30% 30 min	5	,0000		
MgCl2 30% 60 min	5	,0000		
MgCl2 20% 15 min	5	,3200		
MgCl2 30% 15 min	5	,5600		
MgCl2 20% 30 min	5	,6400		
MgCl2 20% 60 min	5	,6400		
MgCl2 15% 60 min	5	1,4400		

MgCl2 15% 30 min	5	4,4800		
MgCl2 15% 15 min	5	16,0000	16,0000	
MgCl2 10% 30 min	5	35,6000	35,6000	
MgCl2 10% 60 min	5	39,9200	39,9200	
MgCl2 10% 15 min	5		51,2000	51,2000
Control 30 min	5			93,9200
Control 15 min	5			96,0000
Control 60 min	5			96,0000
Sig.		,151	,316	,060

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Según las pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas, se concluye que existen diferencias significativas entre los tratamientos

d) 2-propanol

La distribución de los porcentajes de viabilidad espermática no mostro una distribución normal a pesar de la transformación de los datos ($\text{sig} < 0.05$).

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Viabilidad espermática ME (%)	ArcSin Viabilidad espermática ME (%)
N		75	75
Parámetros normales ^{a,b}	Media	20,0213	,3081
	Desviación típica	38,24269	,54037
	Absoluta	,447	,376
Diferencias más extremas	Positiva	,447	,376
	Negativa	-,300	-,284
Z de Kolmogorov-Smirnov		3,872	3,252
Sig. asintót. (bilateral)		,000	,000

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

La prueba de Levene con una $\text{sig}.0.00 < 0.05$ indica que las varianzas son heterogéneas

Prueba de homogeneidad de varianzas

Viabilidad espermática ME (%)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
6,011	14	60	,000

Debido a los resultados anteriores se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para evaluar la diferencia estadística de los tratamientos y se respaldaron los resultados con un ANOVA y el test de Tukey.

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Viabilidad espermática ME (%) es la misma entre las categorías de Tratamiento_General.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

ANOVA de un factor

Viabilidad espermática ME (%)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	106726,110	14	7623,294	305,107	,000
Intra-grupos	1499,136	60	24,986		
Total	108225,246	74			

Pruebas robustas de igualdad de las medias^b

Viabilidad espermática ME (%)

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch

a. Distribuidos en F asintóticamente.

b. No se pueden realizar las pruebas robustas de la igualdad de medias para Viabilidad espermática ME (%) porque al menos un grupo tiene varianza 0.

Viabilidad espermática ME (%)

HSD de Tukey^a

Tratamiento_General	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
2-prop 20% 60 min	5	,0000	
2-prop 30% 15 min	5	,0000	
2-prop 30% 30 min	5	,0000	
2-prop 30% 60 min	5	,0000	
2-prop 10% 60 min	5	,0800	
2-prop 15% 60 min	5	,0800	
2-prop 20% 15 min	5	,0800	
2-prop 20% 30 min	5	,1600	
2-prop 15% 30 min	5	,2400	
2-prop 15% 15 min	5	,6400	
2-prop 10% 30 min	5	3,5200	
2-prop 10% 15 min	5	9,6000	
Control 30 min	5		93,9200
Control 15 min	5		96,0000
Control 60 min	5		96,0000
Sig.		,170	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Según las pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas, se concluye que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

11.1.3. Determinación del Crioprotector No Permeable

ESPERMATOFORO

La distribución de los porcentajes de viabilidad espermática obtenidos durante esta fase del experimento no mostró una distribución normal a pesar de la transformación logarítmica y Arcoseno de los datos (sig.<0.05).

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

	VE del Espermatóforo	ArcSen Raíz VE Esp	Log VE Esp
--	-------------------------	-----------------------	------------

N		70	70	70
Parámetros normales ^{a,b}	Media	63,0543	,9246	3,9869
	Desviación típica	26,00058	,29772	,74563
	Absoluta	,200	,183	,238
Diferencias más extremas	Positiva	,129	,114	,223
	Negativa	-,200	-,183	-,238
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,675	1,529	1,993
Sig. asintót. (bilateral)		,007	,019	,001

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

La prueba de Levene con una sig. $0.02 < 0.05$ indica que las varianzas son heterogéneas.

Prueba de homogeneidad de varianzas

VE del Espermatóforo

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,342	12	57	,016

Debido a los resultados anteriores se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para evaluar la diferencia estadística de los tratamientos y se respaldaron los resultados con un ANOVA y el test de Tukey.

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de ASV del Espermatóforo es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

ANOVA de un factor

VE del Espermatóforo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	39680,026	12	3306,669	27,057	,000
Intra-grupos	6966,048	57	122,211		
Total	46646,074	69			

VE del Espermatóforo

HSD de Tukey^{a,b}

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
MeOH + Sac	5	8,4000					
MeOH + Manitol	5	30,7200	30,7200				
MgCl ₂ + Manitol	5	31,1200	31,1200				
MgCl ₂ + Sac	5		48,6000	48,6000			
DMSO + Manitol	5			58,3200	58,3200		
MeOH + PEG	5			63,6000	63,6000	63,6000	
MgCl ₂ + PEG	5			70,2400	70,2400	70,2400	70,2400
DMSO + Sac	5				75,1200	75,1200	75,1200
MeOH + LD	5				77,0400	77,0400	77,0400
DMSO + LD	5				78,3200	78,3200	78,3200
DMSO + PEG	5				80,6400	80,6400	80,6400
MgCl ₂ + LD	5					83,8400	83,8400
Control	10						88,4000
Sig.		,072	,330	,106	,084	,169	,307

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,200.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales.

Según las pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas, se concluye que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

MASA ESPERMATICA

La distribución de los porcentajes de viabilidad espermática obtenidos durante esta fase del experimento no mostró una distribución normal, sin embargo, la transformación de los datos empleando el Arcoseno de la raíz cuadrada de los datos resultó en una distribución normal ($\text{sig}.0.053 > 0.05$).

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		VE de la Masa Espermática	Arco Sen ME	Log ME
N		75	75	75
Parámetros normales ^{a,b}	Media	77,1093	1,0916	1,8667
	Desviación típica	18,84624	,22296	,19011
Diferencias más extremas	Absoluta	,190	,156	,288

	Positiva	,153	,098	,261
	Negativa	-,190	-,156	-,288
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,641	1,347	2,493
Sig. asintót. (bilateral)		,009	,053	,000

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

La prueba de Levene con una sig. $0.00 < 0.05$ indica que las varianzas son heterogéneas.

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Arco Sen ME	5,392	13	61	,000
VE de la Masa Espermática	7,094	13	61	,000

Debido a los resultados anteriores se empleó el ANOVA de Welch con los datos transformados mediante el Arcoseno, y el test de Tukey para determinar la agrupación de subconjuntos.

ANOVA de un factor

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Arco Sen ME	Inter-grupos	2,275	13	,175	7,602	,000
	Intra-grupos	1,404	61	,023		
	Total	3,679	74			
VE de la Masa Espermática	Inter-grupos	15641,207	13	1203,170	6,896	,000
	Intra-grupos	10642,176	61	174,462		
	Total	26283,383	74			

Pruebas robustas de igualdad de las medias

		Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Arco Sen ME	Welch	10,927	13	22,130	,000
VE de la Masa Espermática	Welch	10,300	13	22,013	,000

a. Distribuidos en F asintóticamente.

Arco Sen ME

HSD de Tukey^{a,b}

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5

MgCl2 + Manitol	5	,6725				
MeOH + PEG	5	,8659	,8659			
MeOH + Manitol	5	,9173	,9173	,9173		
MgCl2 + Sac	5	,9271	,9271	,9271	,9271	
DMSO + Sac	5		1,0494	1,0494	1,0494	1,0494
DMSO + PEG	5		1,0979	1,0979	1,0979	1,0979
DMSO + Manitol	5		1,0999	1,0999	1,0999	1,0999
MgCl2 + PEG	5		1,1164	1,1164	1,1164	1,1164
MgCl2 + LD	5		1,1478	1,1478	1,1478	1,1478
Control 30 min	10		1,1901	1,1901	1,1901	1,1901
MeOH + Sac	5			1,2008	1,2008	1,2008
Control 15 min	5				1,2523	1,2523
MeOH + LD	5					1,3115
DMSO + LD	5					1,3359
Sig.		,303	,057	,163	,056	,152

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,185.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales.

Según las pruebas estadísticas paramétricas se concluye que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

11.1.4. Evaluación Post-Vitrificación

ESPERMATOFORO

La distribución de los porcentajes de viabilidad espermática post- vitrificación no mostro una distribución normal a pesar de la transformación de los datos (sig<0.05).

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra			
		VE Esp.	ArcSin
N		20	20
Parámetros normales ^{a,b}	Media	4,4400	,1502
	Desviación típica	8,74423	,16358
	Absoluta	,411	,395
Diferencias más extremas	Positiva	,411	,395
	Negativa	-,322	-,298
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,840	1,765
Sig. asintót. (bilateral)		,002	,004

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

La prueba de Levene con una sig. $0.00 < 0.05$ indica que las varianzas son heterogéneas.

Prueba de homogeneidad de varianzas

VE Esp.

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
13,341	3	16	,000

Debido a los resultados anteriores se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para evaluar la diferencia estadística de los tratamientos y se respaldaron los resultados con un ANOVA y el test de Tukey.

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de ASV Esp. es normal con la media 4,440 y la desviación típica 8,74.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	,002	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

ANOVA de un factor

VE Esp.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	940,960	3	313,653	9,805	,001
Intra-grupos	511,808	16	31,988		
Total	1452,768	19			

VE Esp.

HSD de Tukey^a

Tratamiento Esp.	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
CONTROL	5	,4000	16,3200
DMSO + LD	5	,4800	
MeOH + LD	5	,5600	
MgCl2 + LD	5		
Sig.		1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Según las pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas, se concluye que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

MASA ESPERMÁTICA

La distribución de los porcentajes de viabilidad espermática post- vitrificación no mostro una distribución normal a pesar de la transformación de los datos ($\text{sig} < 0.05$).

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		VE ME	ArcSinME
N		20	20
Parámetros normales ^{a,b}	Media	20,6400	,3458
	Desviación típica	35,28826	,45760
	Absoluta	,427	,397
Diferencias más extremas	Positiva	,427	,397
	Negativa	-,283	-,269
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,911	1,775
Sig. asintót. (bilateral)		,001	,004

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

La prueba de Levene con una $\text{sig}.0.01 < 0.05$ indica que las varianzas son heterogéneas

Prueba de homogeneidad de varianzas

VE ME

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
4,929	3	16	,013

Debido a los resultados anteriores se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para evaluar la diferencia estadística de los tratamientos y se respaldaron los resultados con un ANOVA y el test de Tukey.

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de ASV ME es la misma entre las categorías de Tratamiento Esp..	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,002	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

ANOVA de un factor

VE ME

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	23241,792	3	7747,264	296,421	,000
Intra-grupos	418,176	16	26,136		
Total	23659,968	19			

VE ME

HSD de Tukey^a

Tratamiento Esp.	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
CONTROL	5	,4000	
MeOH + LD	5	,8800	
DMSO + LD	5	1,6000	
MgCl2 + LD	5		79,6800
Sig.		,982	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Según las pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas, se concluye que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

11.1.5. Determinación de la Solución compleja Post-Vitrificación

ESPERMATOFORO

La distribución de los porcentajes de viabilidad espermática post- vitrificación no mostro una distribución normal a pesar de la transformación de los datos (sig<0.05).

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		VE del Espermatóforo	ArcSin Sol. Com. ESP	Log Sol. Com. ESP
N		60	60	60
Parámetros normales ^{a,b}	Media	33,2333	,5465	2,4356
	Desviación típica	35,15130	,43349	1,72008
Diferencias más extremas	Absoluta	,297	,259	,229
	Positiva	,297	,259	,132

Negativa	-,178	-,146	-,229
Z de Kolmogorov-Smirnov	2,300	2,005	1,772
Sig. asintót. (bilateral)	,000	,001	,004

- a. La distribución de contraste es la Normal.
b. Se han calculado a partir de los datos.

La prueba de Levene con una sig.0.00<0.05 indica que las varianzas son heterogéneas.

Prueba de homogeneidad de varianzas

VE del Espermatofores

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
5,005	15	64	,000

Debido a los resultados anteriores se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para evaluar la diferencia estadística de los tratamientos y se respaldaron los resultados con un ANOVA y el test de Tukey.

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las medianas de ASV del Espermatofores son las mismas entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de medianas de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.
2	La distribución de ASV del Espermatofores es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

ANOVA de un factor

VE del Espermatofores

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	84505,376	15	5633,692	147,913	,000
Intra-grupos	2437,632	64	38,088		
Total	86943,008	79			

VE del Espermatofores

HSD de Tukey^a

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
MeOH + LD + SFB	5	1,0400		

MeOH + LD + Av	5	1,5200		
DMSO + LD + YH	5	2,5600		
MeOH + LD + ST	5	4,0000		
DMSO + LD + SFB	5	5,3600		
DMSO + LD + Av	5	5,3600		
MeOH + LD + YH	5	13,2000		
DMSO + LD + ST	5		60,0000	
MgCl2 + LD + ST	5		70,9600	70,9600
MgCl2 + LD + SFB	5		71,4400	71,4400
MgCl2 + LD+ YH	5			78,2400
MgCl2 + LD + Av	5			85,1200
Sig.		,235	,316	,089

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Según las pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas, se concluye que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

MASA ESPERMATICA

La distribución de los porcentajes de viabilidad espermática post- vitrificación mostro una distribución normal únicamente con la transformación logarítmica de los datos (sig. 0.182>0.05).

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		VE del Espermatóforo	ArcSen Sqrt ME	Log ME
N		80	80	80
Parámetros normales ^{a,b}	Media	21,0898	,4101	1,0071
	Desviación típica	26,92611	,33595	,55422
Diferencias más extremas	Absoluta	,280	,218	,122
	Positiva	,280	,218	,113
	Negativa	-,221	-,151	-,122
Z de Kolmogorov-Smirnov		2,503	1,952	1,095
Sig. asintót. (bilateral)		,000	,001	,182

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

La prueba de Levene con una $\text{sig. } 0,008 < 0.05$ indica que las varianzas son heterogéneas

Prueba de homogeneidad de varianzas

Log ME

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,412	15	64	,008

Como los datos poseen una distribución normal pero las varianzas no son homogéneas se empleó el ANOVA de Welch.

ANOVA de un factor

Log ME

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	22,128	15	1,475	44,164	,000
Intra-grupos	2,138	64	,033		
Total	24,265	79			

Pruebas robustas de igualdad de las medias

Log ME

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch	87,154	15	24,040	,000

a. Distribuidos en F asintóticamente.

Log ME

HSD de Tukey^a

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
DMSO + LD+ ST	5	,3505					
CONTROL Av	5	,3591					
MeOH + LD+ Av	5	,3826	,3826				
CONTROL SFB	5	,5681	,5681	,5681			
MeOH + LD+ SFB	5	,6079	,6079	,6079			
MeOH + LD+ ST	5	,7028	,7028	,7028	,7028		
CONTROL ST	5		,7905	,7905	,7905		
MeOH + LD+ YH	5			,8274	,8274	,8274	
DMSO + LD+ Av	5			,8571	,8571	,8571	

Prueba de muestras independientes							
DMSO + LD+ SFB	5				1,1030	1,1030	
CONTROL YH	5				1,1060	1,1060	
DMSO + LD+ YH	5					1,2343	
MgCl2 + LD+ ST	5						1,7059
MgCl2 + LD+ SFB	5						1,8155
MgCl2 + LD+ YH	5						1,8489
MgCl2 + LD+ Av	5						1,8539
Sig.		,179	,055	,484	,061	,057	,995

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Según las pruebas estadísticas ANOVA y Test de Tukey, se concluye que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Prueba t-student entre los tratamientos con y sin *Aloe vera*

Descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Error típico
T1: MgCl2 10% 15 min + SM 5%	10	72,9230	10,32095	3,26377
T2: <i>Aloe vera</i> 10% MgCl2 10% 15 min + SM 5%	10	78,5200	13,74052	4,34513
Total	20	75,7215	12,17103	2,72153

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de ASV es normal con la media 75,722 y la desviación típica 12,17.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	,486	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

Los datos cumplen con las premisas de la distribución normal.

Como la prueba de Levene posee una significancia de $0,754 > 0,05$ se acepta hipótesis de homogeneidad de varianzas.

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias				
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia
VE							
Se han asumido varianzas iguales	,101	,754	-1,030	18	,317	-5,59700	5,43437
No se han asumido varianzas iguales			-1,030	16,703	,318	-5,59700	5,43437

La significancia bilateral es de 0,317 > 0,05 por lo que se acepta la hipótesis de igualdad de medias, se entiende que el tratamiento 1 con MgCl₂ 10% 15min+ leche descremada 5% no es significativamente diferente del tratamiento 2 con *Aloe vera* 10% + MgCl₂ 10% 15min+ leche descremada 5%.

11.2. GALERÍA FOTOGRÁFICA

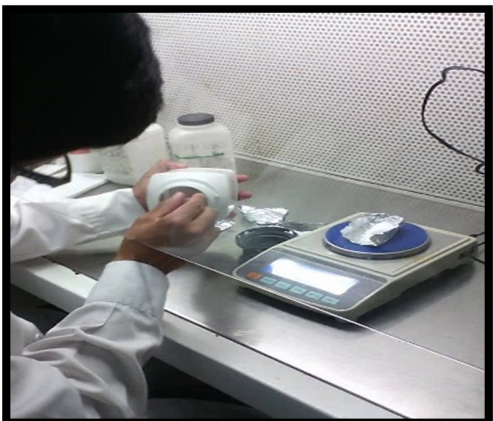





	
<p>A. Pesado estéril de los componentes sólidos de las soluciones dentro de la cámara de flujo laminar.</p>	<p>B. Calibración del pH de las soluciones de extensión previo a la esterilización en autoclave.</p>
	
<p>C. Preparación de soluciones crioprotectoras a distintas concentraciones en tubos cubiertos con papel aluminio.</p>	<p>D. Preparación de la nigrosina en agua estéril con formalina, previo al tamizado con papel filtro.</p>
	
<p>E. Preparación de la eosina acuosa mediante tamizaje con papel filtro y mezcla con ayuda de un vortex.</p>	

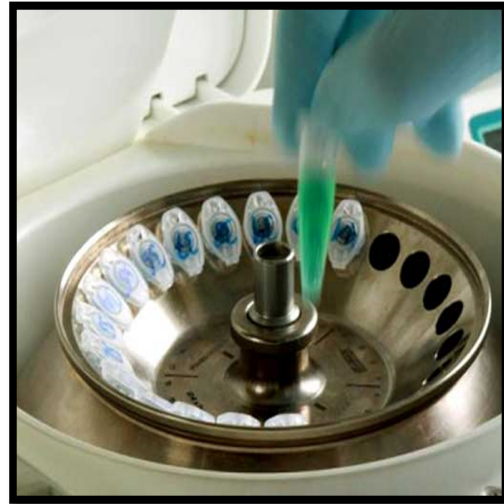
Figura 25. Fotografías de la preparación de soluciones crioprotectoras y colorantes eosina-nigrosina en el laboratorio de Biología Molecular-Incabiotech S.A.C.



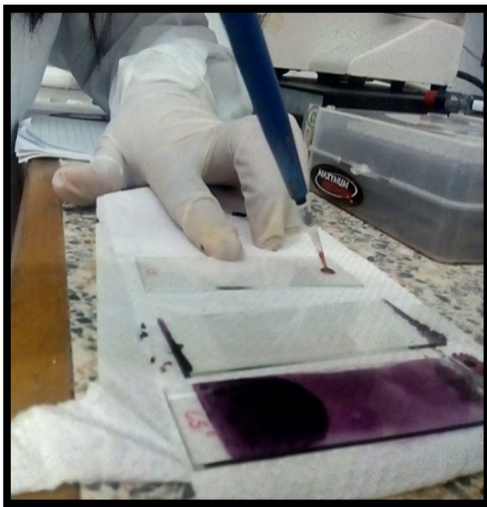
Figura 26. Fotografías del proceso de extracción y criopreservación del espermatóforo y la masa espermática de *Litopenaeus vannamei* en el laboratorio de Biología Molecular del CIDPL-MarinaSol S.A



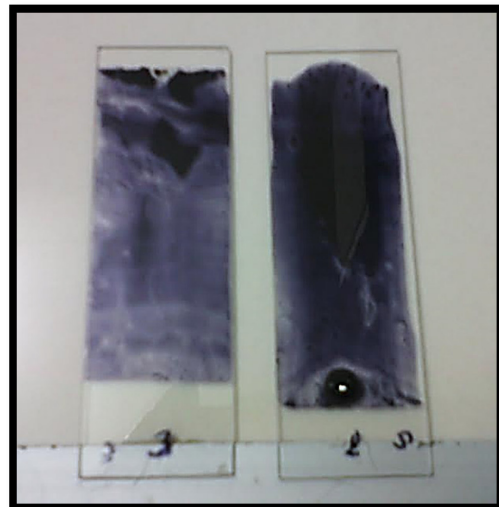
A. Descongelamiento de los crioviales en baño maría a 30°C durante 5 minutos.



B. Centrifugado de la muestra a 1500 rpm durante 5 minutos, etapa previa al doble enjuague en SS Ca-free + Sacarosa 0.2 M.



C. Preparación de la lámina con la muestra y los colorantes de la técnica con eosina-nigrosina.



D. Frotis y secado a temperatura ambiente para la evaluación de la viabilidad espermática.

Figura 27. Fotografías del proceso de descongelamiento y evaluación de espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* en el laboratorio de Biología Molecular del CIDPL-MarinaSol S.A.

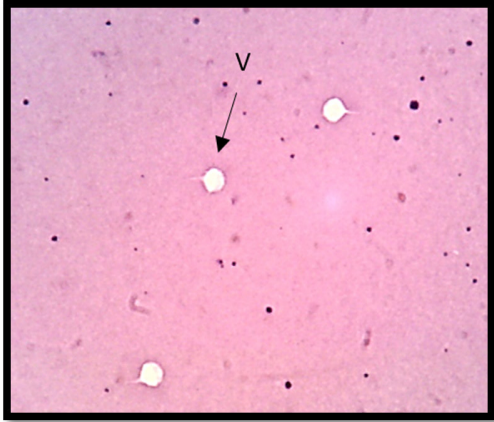
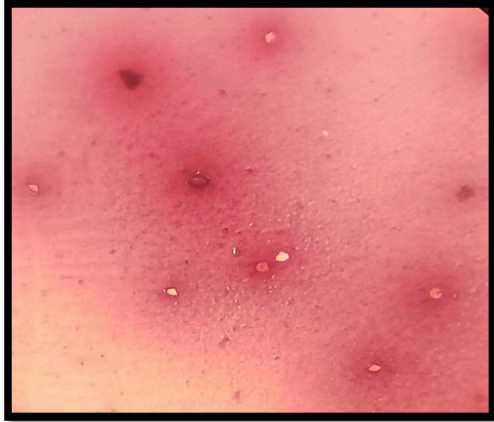
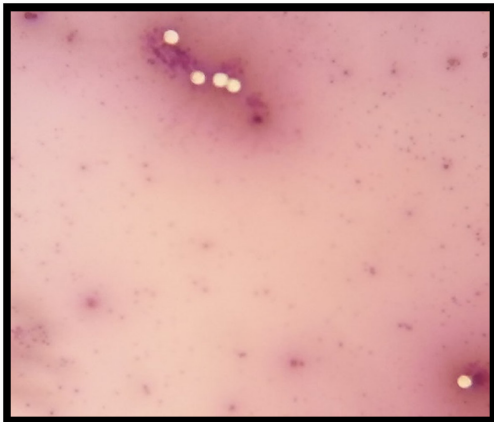
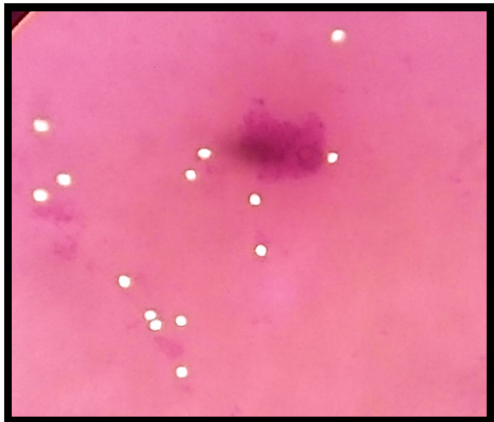
	
<p>A. Evaluación de la viabilidad espermática de esperma fresca de <i>Litopenaeus vannamei</i> en SS Ca-free. Las células viables (V) se observan transparentes.</p>	<p>B. Evaluación de la viabilidad espermática en pruebas de citotoxicidad con MeOH para la masa espermática. Las células no viables se observan rosáceas.</p>
	
<p>C. Evaluación de la viabilidad espermática en pruebas post vitrificación con <i>Aloe vera</i> 10% MgCl₂ 10% 15 min + leche descremada 10% para el espermátóforo.</p>	<p>D. Evaluación de la viabilidad espermática en pruebas post vitrificación con extracto de <i>Aloe vera</i> 10% MgCl₂ 10% 15 min + leche descremada 5% para la masa espermática.</p>

Figura 28. Fotografías de la evaluación de la viabilidad espermática de *Litopenaeus vannamei* con la técnica de tinción eosina-nigrosina en el laboratorio de Biología Molecular del CIDPL-MarinaSol S.A.



A. Inseminación artificial sobre el telico de la hembra con esperma criopreservada.



B. Sala con tanques de desove. Área de Líneas puras- MarinaSol S.A.



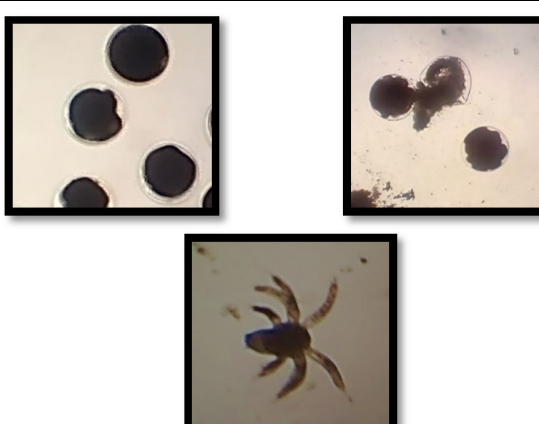
C. Recolección de ovas mediante tamizaje en cubetas con mallas de 300 micras.



D. Recolección de ovas mediante tamizaje en cubetas con mallas de 300 micras.



E. Determinación de la tasa de desove y eclosión de nauplios mediante conteo volumétrico con una pipeta de 1 ml.



F. Ovas (normales y reventadas) y nauplios de *Litopenaeus vannamei* generados mediante IA con esperma criopreservada.

Figura 29. Fotografías del proceso de inseminación artificial (IA) y eclosión de larvas de *Litopenaeus vannamei* en el área de Líneas Puras del CIDPL-MarinaSol S.A.